



**Universidad**  
Zaragoza

## Trabajo Fin de Grado

Aislamiento de especies de *Trichoderma* en suelos  
dedicados al cultivo de arroz en España

Isolation of *Trichoderma* species in Spanish soils under  
rice cultivation

Autora

Yana Malymon

Directores

Juan J. Barriuso Vargas

Ester Sales Clemente

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR

2018



## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, los cuatro, GRACIAS por todo. Hace ya casi 20 años tuve el gran privilegio de conocer a dos personas que cambiaron mi vida y gracias a ellos ahora estoy aquí. Gracias por la comprensión, la sabiduría, la paciencia, el constante apoyo. Si no fuera por vosotros no habría conseguido todo esto.

A toda mi familia, que no es nada pequeña, y nada más y nada menos, está repartida entre dos países. Gracias por todo el apoyo que me habéis dado, no solo durante la realización del proyecto, sino también a lo largo de la carrera.

A Carlos por estar a mi lado y apoyarme en los malos momentos cuando todo se ve tan negro.

A Julia por tu amistad, apoyo y esa alegría que contagias a todos.

A Juan José por confiar en mí, por aprender cada día algo nuevo y tener esa paciencia conmigo. Gracias por dirigir este proyecto y haberme permitido trabajar contigo.

A Ester por aprender tantas cosas y por la paciencia que has tenido conmigo. Gracias por tu tiempo y disposición para codirigir este trabajo.

A Asun y Belén, sois unas técnicas maravillosas. Por vuestra disposición y ayuda en cualquier momento, y por el ánimo que me dabais todos los días.

A Agustín Perdiguer, Luis Marqués y José Luís Angoy por proporcionarme las muestras de suelo y la información sobre ellos.

A Karina Solis por enseñarme más sobre el mundo de *Trichoderma* y el trabajo de laboratorio.

A Ana Garcés por ayudarme con esas PCRs que no siempre salían.

A Merche García por el constante apoyo durante toda la carrera y esa tranquilidad que transmites.

A Toño y Chuso por tantas y tantas horas que habéis pasado conmigo explicando una y otra vez los problemas de matemáticas y física.

A todos los profesores de la Escuela Politécnica Superior por haberme transmitido conocimientos durante la carrera y que me han servido para poder realizar el proyecto.

## ПОДЯКА

Моїм батькам, всім чотирьом, ДЯКУЮ за все. Вже майже 20 років тому я мала велику привілегію познайомитися з двома людьми, які змінили моє життя і дякуючи їм я сьогодні тут. Дякую за розуміння, мудрість, терпіння, постійну підтримку. Без вас, я б всього цього не здобула.

Всій моїй родині, яка роділена між двома країнами. Дякую за всю підтримку, яку ви дали мені не тільки під час проекту, але і протягом всього навчання.

Карлосу за те, що він був зі мною та підтримав мене в погані моменти, коли все виглядало настільки темним.

Юлії за дружбу, підтримку та ту радість, яку ти захоплюєш всім.

Хуану Хосе за довіру, що кожного дня навчаєш мене щогось нового і маєш таке терпіння зі мною. Дякую за керування цим проектом і, що дозволив мені працювати з тобою.

Естер, що навчила так багато, і за терпіння яке ти мала зі мною. Дякую за час який ти виділила на цей проект і за співкерування ним.

Асун і Белен, ви чудові техніки. За вашу готовність і допомогу в будь-який час, і за підтримку яку ви давали мені кожного дня.

Агустіну Пердігеру, Луїсу Маркесу та Хосе Луїсу Ангою за надання зразків ґрунту та інформації про них.

Каріні Соліс, що дала познати більше про світ Трікодерми та лабораторних робіт.

Ганні Гарсес за те, що допомагала мені з тими ПСР, що не завжди виходили.

Мерче Гарсії за постійну підтримку протягом всього навчання та спокій, який ти передаєш.

Тоньо і Чусо за стільки годин, що ви провели зі мною, знову і знову пояснюючи проблеми з математики та фізики.

Усім викладачам Вищого Політехнічного Училища за те, що вони передали знання під час навчання, і які допомогли мені виконати цей проект.

*A Svetlana y Sergio, Piluca y Patxi...*



## ÍNDICE GENERAL

Índice de Figuras	ii
Índice de Tablas	iii
Resumen	v
Abstract	vi
1. Introducción	1
1.1. El género <i>Trichoderma</i>	1
1.2. Taxonomía del género <i>Trichoderma</i>	3
1.3. Caracterización molecular de <i>Trichoderma</i> spp.	4
1.4. Usos de <i>Trichoderma</i> en agricultura	5
2. Objetivos	11
3. Material y métodos	13
3.1. Aislamiento de colonias fúngicas en suelos arroceros	13
3.2. Identificación microscópica de las colonias fúngicas aisladas	15
3.3. Caracterización molecular de los aislados fúngicos	16
4. Resultados y discusión	17
5. Conclusiones	27
6. Bibliografía	29
7. Anejos	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	A) <i>Trichoderma</i> enrollando sus hifas sobre las del hongo fitopatógeno <i>Rhizoctonia</i> . SEM Ampliación: 2350x (BIOPHOTO ASSOCIATES, Gettyimages). B) <i>Trichoderma</i> formando apresorios sobre la hifa de <i>Rhizoctonia</i> C) Hifa de <i>Rhizoctonia</i> sp., mostrando la marca que deja <i>Trichoderma</i> al retirar la hifa (Harman y col., 2004).	6
<b>FIGURA 2</b>	Diagrama que representa la interacción molecular y metabólica entre <i>T. virens</i> y las raíces de las plantas. Suc – sacarosa, Glc – glucosa, Fr – fructosa, ISR - resistencia sistémica inducida (Vargas y col., 2013).	8
<b>FIGURA 3</b>	Distribución de la superficie de arroz, expresada en hectáreas, en España por comunidades autónomas en el periodo 2016/2017 (MAPAMA, 2017).	9
<b>FIGURA 4</b>	Procesamiento en laboratorio de las muestras del suelo. A) Secado al aire del suelo. B) Suelo seco y tamizado. C) Homogenización de la extracción en vórtex. D) Diluciones seriadas de cada muestra de extracto de suelo. E) Incubación de las placas de medio tras la siembra de las muestras.	14
<b>FIGURA 5</b>	Colonias de <i>Trichoderma</i> cultivadas en medio selectivo (A) y medio no selectivo (B) de las muestras de suelos arroceros.	17
<b>FIGURA 6</b>	Todas las colonias de <i>Trichoderma</i> aisladas de los suelos arroceros crecidas en PDA.	19
<b>FIGURA 7</b>	Colonias de <i>Trichoderma</i> aisladas de suelos dedicados al cultivo de arroz creciendo en medio PDA. Colonias de <i>T. harzianum</i> (A), <i>T. saturnisporum</i> (B) y <i>T. longibraquiutum</i> (C).	20
<b>FIGURA 8</b>	Número medio de colonias de distintos géneros fúngicos aisladas en medio PDA empleando una dilución 1/100 de extractos de suelos arroceros (14 parcelas de cuatro localidades españolas). Las especies fueron sometidas a la prueba no paramétrica de Kolmogrow-Smirnoff (test H de Kruskal-Wallis) y se analizaron mediante la separación de medias con el test U de Mann-Whitney ( $p < 0.01$ ).	21
<b>FIGURA 9</b>	Colonias aisladas de géneros fúngicos más frecuentes en suelos dedicados al cultivo del arroz, que crecieron en medio PDA. Colonias de <i>Cercophora</i> (A), <i>Acremonium</i> (B), <i>Mucor</i> (C) y <i>Aspergillus</i> (D).	25



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1</b>	Localización de las parcelas en las que se recogieron las muestras de suelo empleadas en el estudio.	13
<b>TABLA 2</b>	Composición del medio selectivo para <i>Trichoderma</i> o TSM (Askew & Laing, 1993).	15
<b>TABLA 3</b>	Número total de colonias de <i>Trichoderma</i> aisladas a partir de 14 muestras de suelo procedentes de parcelas dedicadas al cultivo de arroz en Badajoz (B), Huesca (H), Valencia (V) y Zaragoza (Z). Se presentan también los resultados de las determinaciones de pH y conductividad de las muestras.	18
<b>TABLA 4</b>	Especies de <i>Trichoderma</i> identificadas a partir de las secuencias de la región ITS obtenidas para cada colonia aislada de muestras de suelos empleando diluciones 1/100 y 1/100, tanto en medio básico como en medio selectivo. Para cada secuencia se muestra el porcentaje de similitud con la accesión de Genbank de mayor coincidencia.	19
<b>TABLA 5</b>	Número medio de colonias por placa para cada género fúngico identificado en TSM tras inocular extractos de suelo (dilución 1/100) de 14 parcelas dedicadas al cultivo de arroz en Badajoz (B), Huesca (H), Valencia (V) y Zaragoza (Z).	22
<b>TABLA 6</b>	Especies fúngicas identificadas mediante secuenciación de la región ITS de XX colonias aisladas de los suelos dedicados al cultivo de arroz de las cuatro provincias estudiadas. Para cada aislado se muestra el porcentaje de similitud con la accesión de Genbank de mayor coincidencia.	23



## Resumen

*Trichoderma* spp., es un hongo cosmopolita, fundamentalmente edáfico, presente en altas densidades de raíces vegetales y que dispone de mecanismos de acción contra otros organismos competidores y de aprovechamiento eficiente de nutrientes. El presente trabajo tuvo como objetivo aislar e identificar a nivel taxonómico de especie, colonias de *Trichoderma* obtenidas en suelos de plantaciones de arroz (*Oryza sativa* L.) de cuatro provincias españolas. También se determinó la diversidad fúngica específica de las muestras analizadas. A través de la técnica de dilución seriada se obtuvieron unidades formadoras de colonias (UFC) de hongos en medio no selectivo y en medio de cultivo selectivo para *Trichoderma*. Se aislaron y cultivaron en PDA todas las colonias con características morfológicas correspondientes con *Trichoderma* y también al menos una colonia de cada género fúngico diferente identificado al microscopio. Se aislaron colonias de *Trichoderma* de suelos procedentes de parcelas de Badajoz (9 colonias en dos muestras de las dos parcelas analizadas), de Huesca (6 colonias obtenidas en tres parcelas de las 4 analizadas) y Valencia y Zaragoza (una colonia en una muestra de 4 analizadas de cada provincia). La región genómica ITS de las 17 colonias de *Trichoderma* aisladas se amplificó y secuenció para identificar cada una a nivel de especie, y se determinaron como pertenecientes a tres especies diferentes: *T. harzianum* (15 colonias), *T. longibrachiatum* (1) y *T. saturnisporum* (1). Para la caracterización en cada muestra de suelo de la cohorte fúngica cultivable, se emplearon criterios morfológicos para identificar el género y el análisis molecular ITS para validar dicha identificación a partir de una colonia, determinando de esta manera las especies correspondientes. De esta forma, en nuestros ensayos se obtuvieron colonias, además de *Trichoderma*, de 8 géneros de hongos: *Acremonium* (*A. sclerotigenum*), *Alternaria* (*A. alternata*, *A. arborescens*, *A. daucifolii* y *A. gaisen*), *Aspergillus* (*A. alabamensis*, *A. carneus*, *A. niveus*, *A. oryzae*, *A. tamarii* y *A. terreus*), *Cercophora* (*C. coprophila*), *Mortierella* (*M. alpina*), *Mucor* (*M. circinelloides*), *Penicillium* (*P. samsonianum*, *P. halotolerans* y *P. chrysogenum*) y *Strachybotrys* (*S. cf. elegans*).

## Abstract

*Trichoderma* spp., is a cosmopolitan fungus typically inhabitant of the soil, specially at high root densities, and which has developed active mechanisms against other fungus, taking advantage of additional nutrients. The present study was undertaken to isolate and to identify *Trichoderma* species in rice plantations soils (*Oryza sativa*) located in four Spanish provinces. The fungal diversity of the soil samples was also studied. Through the serial dilution technique, we obtained colony-forming units (CFU) of fungi by using cultivation methods specific for *Trichoderma*, and also in a non-selective medium. All the colonies showing morphological characteristics corresponding to *Trichoderma*, and also at least one colony of each other fungal genus identified under the microscope were cultivated in PDA medium. 17 *Trichoderma* colonies were isolated from soils dedicated to rice cultivation sampled in Badajoz (9 colonies from the two plots analyzed), Huesca (6 colonies obtained in three plots out of the 4 analyzed) and Valencia and Zaragoza (a colony in a sample of 4 analyzed from each province). The ITS region from these 17 colonies was amplified and sequenced, and from these data three species of *Trichoderma* were distinguished: *T. harzianum* (15 colonies), *T. longibrachiatum* (1 colony) and *T. saturnisporum* (1 colony). For the characterization in each soil sample of the cultivable fungal cohort, morphological criteria were used to identify the genus and the analysis of the ITS sequence was employed to validate such identification from a colony, thus determining the corresponding species. Then, besides *Trichoderma* other 8 fungal genera were isolated in the 14 soil samples studied: *Acremonium* (*A. sclerotigenum*), *Alternaria* (*A. alternata*, *A. arborescens*, *A. daucifolii* y *A. gaisen*), *Aspergillus* (*A. alabamensis*, *A. carneus*, *A. niveus*, *A. oryzae*, *A. tamaris* y *A. terreus*), *Cercophora* (*C. coprophila*), *Mortierella* (*M. alpina*), *Mucor* (*M. circinelloides*), *Penicillium* (*P. samsonianum*, *P. halotolerans* y *P. chrysogenum*) y *Strachybotrys* (*S. cf. elegans*).

## 1.- Introducción

### 1.1.- El género *Trichoderma*

*Trichoderma* es un género de hongos imperfectos, de reproducción asexual, considerado como un grupo de vida libre. Las especies de *Trichoderma* son comunes en los ecosistemas de suelo y rizosfera y sobre restos de materia orgánica, pudiendo ser también simbiontes de plantas (endófitos) y micoparásitas (Harman y col., 2004). Estas características han convertido a algunas especies de este género en organismos útiles para el control biológico en multitud de cultivos, ya que estos hongos actúan directamente como antagonistas de muchos microorganismos fitopatógenos, además de promover del crecimiento vegetal y de inducir resistencia sistémica (Mendoza-Mendoza y col., 2018), de forma que mejoran el comportamiento de los cultivos en condiciones adversas, tanto de estrés biótico como abiótico (Sharma y col., 2017).

Dado que este hongo puede aislarse de prácticamente todos los ecosistemas, presenta una gran diversidad de hábitats. Sin embargo, algunas especies como *Trichoderma harzianum* pueden ser cosmopolitas, mientras que otras están geográficamente limitadas como *Trichoderma viride* y *Trichoderma polysporum*. Existen varios estudios sobre la biodiversidad del género en amplias regiones de Asia (Kubicek y col., 2003; Kullnig y col., 2000; Zhang y col., 2005), y en cuanto a su asociación a especies vegetales endémicas o cosmopolitas (Zachow y col., 2016).

*Trichoderma* coloniza con gran éxito sus hábitats debido a que hace una utilización muy eficiente del sustrato del que dispone, a menudo muy heterogéneo. Tienen capacidad para crecer sobre madera en descomposición y materia orgánica vegetal, sintetizando diversas enzimas en función del medio. Algunas de estas enzimas, básicamente celulasas producidas por *Trichoderma reesei*, tienen aplicación industrial en la fabricación de biocombustibles (Schuster & Schmoll, 2010). Otras especies pueden emplearse para la producción biotecnológica de enzimas como la xilanasa y la quitinasa.

El éxito biológico de *Trichoderma* se debe, por otra parte, a que tiene una gran capacidad de secreción de metabolitos secundarios y enzimas que tienen propiedades antimicrobianas, lo que hace a este género muy competitivo frente a otros organismos en la defensa de su nicho ecológico (lucha por los nutrientes, el espacio y la luz). Estos hongos presentan además gran plasticidad en cuanto a su velocidad de crecimiento y desarrollo, así como una gran capacidad de adaptación al tipo de suelo, pH, salinidad, temperatura y humedad (Benítez y col., 2004; Solís Hidalgo, 2017), aunque en general las especies de *Trichoderma* se encuentran mejor adaptadas a suelos ácidos (Kredics y col., 2003). Por ejemplo, los aislados *T. harzianum* se desarrollan en suelos con pH de 4 a 8 (Hassanein, 2012;

Singh y col., 2014). En condiciones de suelos alcalinos salinos este género ayuda a la disponibilidad y absorción de los nutrientes del suelo por parte de la planta, lo que mejora el contenido de N, P y K de los cultivos (Zhang y col., 2016a). Algunas cepas de *T. harzianum* pueden incluso controlar el pH externo para asegurar que los valores sean los óptimos para sus propias enzimas secretadas (Harman y col., 2004). También se ha estudiado el efecto de la luz sobre el crecimiento de estas especies y sobre algunos de sus procesos metabólicos, como la actividad de sus celulasas. Otros mecanismos de adaptación a su entorno son la regulación del crecimiento y de la reproducción mediante la formación de esporas asexuales, la conidiación.

Se han descrito tres estrategias de reproducción asexual para *Trichoderma*: conidiación, microciclo de conidiación y clamidosporogénesis. En respuesta a ciertos estímulos, *Trichoderma* produce abundantes conidios pulverulentos. Los conidios maduros tienen forma elíptica y su tamaño varía entre especies desde aproximadamente  $2,6 \times 2,0$  a  $5,3 \times 4,0$   $\mu\text{m}$  (Steyahert y col., 2013). En el proceso de la conidiación se pueden describir cinco etapas: en primer lugar, la aparición de hifas verticales, en segundo lugar, la formación de conidióforos, seguida del desarrollo de fiálides en ellos; a continuación, en el interior de las fiálides tiene lugar la producción de conidios hialinos, que posteriormente se desarrollan de blanco a amarillo y luego a verde para formar las fialoconidias maduras. En el caso del microciclo de conidiación, el ciclo de crecimiento normal del hongo se pasa por alto, dando como resultado un ciclo de vida abreviado en el que los conidios germinan directamente formando nuevos conidios sin o con crecimiento micelial muy reducido. Muchos hongos, incluidas las especies de *Trichoderma*, realizan este microciclo de conidiación inducido por una serie de factores asociados con el estrés, como alta temperatura, agotamiento de nutrientes y estrés hídrico, y en cultivo debido a la adición de glutamato al medio de crecimiento. Se cree que el microciclo es un mecanismo de supervivencia en condiciones subóptimas. La tercera forma de reproducción asexual del género *Trichoderma* son las clamidosporas, que se pueden producir en condiciones naturales en el suelo, pero también en cultivos en medios sólidos y líquidos, así como en suelo estéril y en extractos de suelo, y dentro de esclerocios infectados. Son estructuras de supervivencia importantes para las especies de *Trichoderma* en la naturaleza, ya que sobreviven más tiempo en el suelo que los conidios. Se cree que la formación de clamidosporas se induce en el suelo a través de las interacciones con las bacterias del suelo, entre otros factores. Son numerosas las investigaciones sobre la reproducción de *Trichoderma*, de hecho, se considera un modelo para el estudio de la reproducción asexual en hongos (Steyahert y col., 2013).

Como vemos, *Trichoderma* es uno de los géneros de hongos mejor estudiados, dado el interés de sus diferentes aplicaciones. Es posible aislar cepas de *Trichoderma* directamente desde muestras de suelo empleando medios selectivos e incubando los cultivos a 24°C. Las especies de *Trichoderma* presentan un rápido crecimiento cuando se cultivan en laboratorio.

Forman colonias *in vitro* con micelio ligeramente algodonoso de color verde, amarillento a blanco y con diversas formas de esporulación.

Finalmente, es importante destacar que algunas especies de *Trichoderma* son fitopatógenas (Li Destri Nicosia y col., 2015) o causan infecciones en cultivos de champiñón (Samuels y col., 2002), mientras que otras, particularmente algunas cepas oportunistas de *T. longibrachiatum*, causan infecciones en humanos, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos (Hatvani y col., 2013). Curiosamente, esta especie es también fuente de toxinas antifúngicas útiles en tratamientos clínicos (Vicente y col., 2001).

## 1.2.- Taxonomía del género *Trichoderma*

La primera referencia sobre una especie denominada *Trichoderma* data del año 1794. En 1865 se vinculó con el estado sexual de una especie del género *Hypocrea*, pero esta relación no se confirmó hasta 100 años después, cuando *Trichoderma reesei* se identificó como anamorfo de *Hypocrea jecorina*. Entre tanto, se describieron unas 100 especies asignadas al género *Trichoderma* / *Hypocrea* pero fueron difíciles de distinguir morfológicamente, por lo que existe mucha incertidumbre en las identificaciones (Schuster & Schmoll, 2010). En cualquier caso, la mayoría de las especies de *Trichoderma* han sido descritas como anamorfos del género *Hypocrea* Fr. (Bissett y col., 2015). Este género de hongos pertenece a la Familia Hypocreaceae, Orden Hypocreales, Subclase Hypocreomycetidae, Clase Sordariomycetes, Subdivisión Pezizomycotina, División Ascomycota (CABI, 2018 [www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org)).

La taxonomía del género *Trichoderma* ha sido debatida ampliamente. Las primeras clasificaciones fueron difíciles debido a que hay solo unas pocas características morfológicas relativamente invariables que conducen a la superposición entre las especies (Samuels, 2006). Para poder diferenciar unas especies de otras se observa el patrón de la ramificación y la morfología de los conidióforos (Chaverri y col., 2003). El género se subdividió entonces en cinco secciones, denominadas Sección *Trichoderma*, Sección *Longibrachiatum*, Sección *Saturnisporum*, Sección *Pachybasium* y Sección *Hypocreanum* (Bissett, 1991). Posteriormente se fusionaron las secciones *Longibrachiatum*-*Saturnisporum* y se describieron trece clados para agrupar las especies con su taxón y sección dentro de los clados (Solis Hidalgo, 2017). Actualmente, la taxonomía dentro del género está consolidada y se dispone de muestras de diversos hábitats y sustratos de todo el mundo, por lo que las especies están mejor caracterizadas. En la actualidad, encontramos en la base de datos Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>) 383 especies en el género *Trichoderma* y 510 en *Hypocrea*.

### 1.3.- Caracterización molecular de *Trichoderma* spp.

Como ya se ha comentado anteriormente la caracterización morfológica es un tanto complicada, los pocos caracteres disponibles para discriminar entre especies de *Trichoderma* han llevado a que existan especímenes erróneamente identificados.

Por su parte, los métodos moleculares de análisis de genomas basados en la caracterización del polimorfismo de ácidos nucleicos proporcionan un número casi ilimitado de marcadores potenciales para realizar estudios taxonómicos y para reflejar las relaciones filogenéticas entre organismos. De hecho, a finales de la década de 1990 se introdujo la secuenciación de ADN y se aceptó ampliamente como técnica estándar en sistemática fúngica (Atanasova y col., 2013). Las especies de hongos se establecen de acuerdo al concepto *Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition*, (GCPSR), es decir, se trata de especies filogenéticas, relacionadas evolutivamente (Taylor y col., 2000). Se emplea entonces el término *DNA-barcode* o código de barras de ADN, generalmente como resultado de la amplificación y secuenciación de la región ITS, *Internal Transcribed Spacer* en la región nuclear del ADN ribosómico. Estos análisis de diversidad de la secuencia ITS han proporcionado un enfoque potente para la identificación rápida de especímenes de hongos, la generación de nuevas hipótesis de especies, de las estructuras de la biodiversidad y para los estudios ecológicos (Xu, 2016). En la mayoría de las descripciones de nuevos taxones de hongos filamentosos se obtienen y analizan las secuencias ITS, lo que contribuye a la expansión de estas secuencias en el dominio público. Aun antes de que ITS fuera declarado como el código de barras fúngico de consenso, los científicos utilizaron secuencias ITS en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y otras bases de datos públicas para la identificación de especies fúngicas y para ayudar con el reconocimiento de nuevas especies.

Los primeros análisis del ADN para la identificación de *Trichoderma* se realizaron con marcadores moleculares aleatorios del tipo RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) y RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) en especies de *Hypocrea* y *Trichoderma* (Solis Hidalgo, 2017). Posteriormente se han utilizado marcadores específicos de regiones conservadas para identificar distintas especies de *Trichoderma*, como la secuencia del ITS y los marcadores asociados a otros genes como el del factor de elongación de la traducción *1- $\alpha$  (tef1 $\alpha$ )*, el de la endoquitinasa, el de la subunidad 2 de la ARN polimerasa II o *RPB2*, el gen de la  $\alpha$ -actina (ACT) y el de la calmodulina (CAL) (Druzhinina y col., 2005).

Estas técnicas moleculares permitieron la identificación más fiable de las especies de *Trichoderma* y un rápido aumento del número de especies. Las primeras cien especies de *Trichoderma* caracterizadas molecularmente se describieron en el año 2006 (Druzhinina y col., 2006), pero la taxonomía del género se sigue actualizando (Druzhinina y col., 2012).

La disponibilidad de abundante información molecular, particularmente de la región ITS del ADNr de *Hypocrea/Trichoderma*, ha permitido desarrollar una herramienta específica



para la identificación molecular de aislados de estas especies, denominada *TrichOKey 2*, dependiente de la *International Subcomission on Trichoderma and Hypocrea Taxonomy* ([www.isth.info](http://www.isth.info)). Esta herramienta bioinformática permite realizar una comparación de secuencias ITS mediante el algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) comparando con los datos de secuencias pertenecientes a especies de este género (Kopchinskiy y col., 2005). Esta base de datos contiene actualmente 104 especies de *Trichoderma/Hypocrea*.

#### 1.4.- Usos de *Trichoderma* en agricultura

Se ha observado que numerosos microorganismos antagonicos prosperan en los llamados suelos supresivos, que son aquellos en los que el patógeno no puede establecerse o persistir, o que el patógeno existe, pero la cantidad de enfermedad que se desarrolla es inferior a la que correspondería por la cantidad de inóculo y favorabilidad del ambiente. También se ha observado con más frecuencia que la supresión tanto del patógeno como de la enfermedad se debe a hongos como *Trichoderma*, *Penicillium* y *Sporodesmium*, o bien a bacterias del género *Pseudomonas*, *Bacillus*, etc. (Cañizares Monteros, 2003). Por ejemplo, Diáñez-Martínez y col. (2015) aislaron una cepa de *Trichoderma saturnisporum* con potencial como agente de control biológico a partir del suelo de una explotación de Cádiz en la que se había observado menor incidencia de fusariosis en varios cultivos.

Según Ghorbanpour y col. (2018) los mecanismos que subyacen en el efecto beneficioso de hongos como *Trichoderma* frente a las enfermedades de los vegetales son básicamente cinco: a) competencia con los patógenos por espacio y nutrientes; b) micoparasitismo; c) antibiosis; d) protección cruzada mediada por hongos y virus (*mycovirus-mediated cross protection*, MMCP); y e) resistencia sistémica inducida (*induced systemic resistance*, ISR). Como se ha mencionado, *Trichoderma* destaca por su capacidad para la colonización eficaz de numerosos hábitats prevaleciendo frente a otros organismos gracias a la producción de enzimas y compuestos orgánicos activos frente a ellos. Estas especies pueden además ser micoparásitas, desarrollándose a costa de otros hongos, o simplemente antagonistas, sintetizando compuestos que influyen sobre el desarrollo de los organismos patógenos o que alteran las condiciones en las que éstos se desenvuelven. Debido a esto, las especies de *Trichoderma* pueden emplearse como agentes de biocontrol frente a hongos patógenos de plantas cultivadas, tanto mediante el uso de los propios hongos (cepas seleccionadas), como de metabolitos secretados por ellos, que serían entonces fungicidas biológicos (Berlitz y col., 2014; Kumar & Ashraf, 2017).

Cuando *Trichoderma* detecta hifas de otros hongos crece hacia ellas por quimiotropismo positivo (Benítez y col., 2004; Druzhinina y col., 2011). Entra en contacto con estas hifas, se enrolla alrededor de las mismas (Figura 1A) y forma apresorios sobre la superficie de su pared (Figura 1B). Posteriormente, *Trichoderma* produce antibióticos y

quitinasas, glucanasas y proteasas que causan la disolución de la pared celular del hongo hospedante. En los sitios de la pared hifal donde se forman los apresorios se pueden producir orificios (Figura 1C) por donde entran las hifas de *Trichoderma* en el lumen celular del hongo parasitado (Harman y col., 2004).

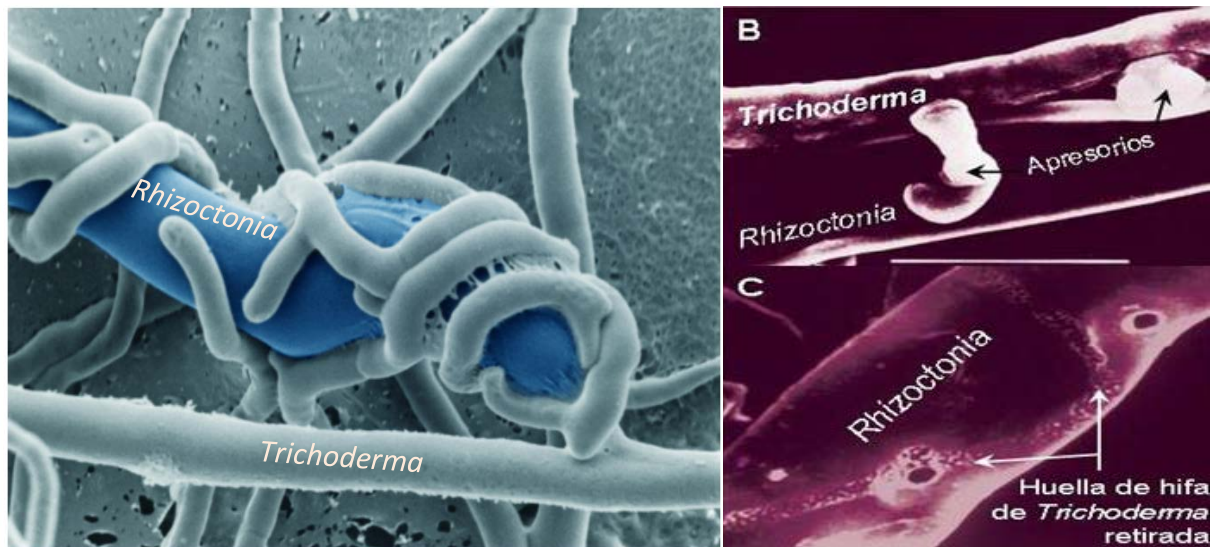


Figura 1. A) *Trichoderma* enrollando sus hifas sobre las del hongo fitopatógeno *Rhizoctonia*. SEM Ampliación: 2350x (BIOPHOTO ASSOCIATES, Gettyimages). B) *Trichoderma* formando apresorios sobre la hifa de *Rhizoctonia* C) Hifa de *Rhizoctonia* sp., mostrando la marca que deja *Trichoderma* al retirar la hifa (Harman y col., 2004).

La interacción entre *Trichoderma*, los hongos fitopatógenos y las plantas ha sido estudiada, y se ha prestado mucha atención al estudio de las enzimas que degradan la pared celular (*cell wall degrading enzymes*, CWDE) (Woo y col., 2006). Sin embargo, la abundancia de genes codificadores de CWDE en el genoma de *Trichoderma* ha dificultado la identificación de las enzimas requeridas para el control biológico, lo que por otra parte sugiere la abundancia de proteínas y metabolitos secundarios biotecnológicamente valiosos que las especies de *Trichoderma* pueden proporcionar.

Se ha encontrado un gran número de proteínas involucradas en procesos de resistencia a enfermedades (por ejemplo, las relacionadas con la patogénesis o proteínas de señalización) en plantas de habas y tomate colonizados por *Trichoderma* spp., con y sin el patógeno (Woo y col., 2006). Esto significa que varios genes de resistencia utilizados para el reconocimiento de metabolitos microbianos se activan por la presencia del hongo beneficioso y probablemente permiten que la planta lo reconozca. En otro estudio se aislaron moléculas inductoras de bajo peso molecular, que estimulan el crecimiento fúngico, así como la producción de antibióticos y enzimas. Los resultados demuestran que estos inductores derivados de la pared celular del hongo hospedante están constituidos por oligosacáridos pequeños (una monoaceto-citobiosa unida a dos unidades de celobiosa) unidos a su vez a un resto de aminoácido (valina u ornitina). Además, se han encontrado

genes similares a *Avr* (genes de avirulencia) y nuevas proteínas que funcionan como compuestos de avirulencia típicos en *Trichoderma* spp., y están probablemente implicados en la resistencia inducida y el reconocimiento del hongo no patógeno. Finalmente, se ha encontrado una variedad de transportadores ABC que pueden utilizar los *Trichoderma* spp. para resistir el impacto de las toxinas producidas por otros microorganismos (fitopatógenos o no) o la planta. Por lo tanto, se considera que la presencia de un gran número y variedad de bombas de membrana efectivas sostiene la capacidad de estos hongos para ser fuertes competidores y explica el alto nivel de resistencia innato de *Trichoderma* spp. frente a una gran variedad de productos químicos (más de 30 pesticidas, hidrocarburos, fenoles, etc.) y toxinas naturales producidas por otros microbios (por ejemplo, lipodepsipéptidos de *Pseudomonas* spp.).

*Trichoderma* produce alrededor de 43 sustancias volátiles y no volátiles con actividad antibiótica. Estas especies fúngicas pueden producir metabolitos que impiden la germinación de las esporas del hongo patógeno (fungistasis) o matar sus células (antibiosis) (Solís Hidalgo, 2017). Entre los compuestos más conocidos que inhiben la germinación de hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora* spp. y *Botritis* spp., figuran las gliotoxinas y gliovirinas producidas por *T. virens*, y la viridina, esta última tóxica para las plantas (Solís Hidalgo, 2017). Algunas especies como *T. atroviride*, *T. viride*, *T. koningii* y *T. hamatum* tienen un olor típico muy característico a coco debido a la producción de alquil pironas. Éstas junto a las especies *T. koningii* y *T. virens* inducen la producción de fitoalexinas terpenoides.

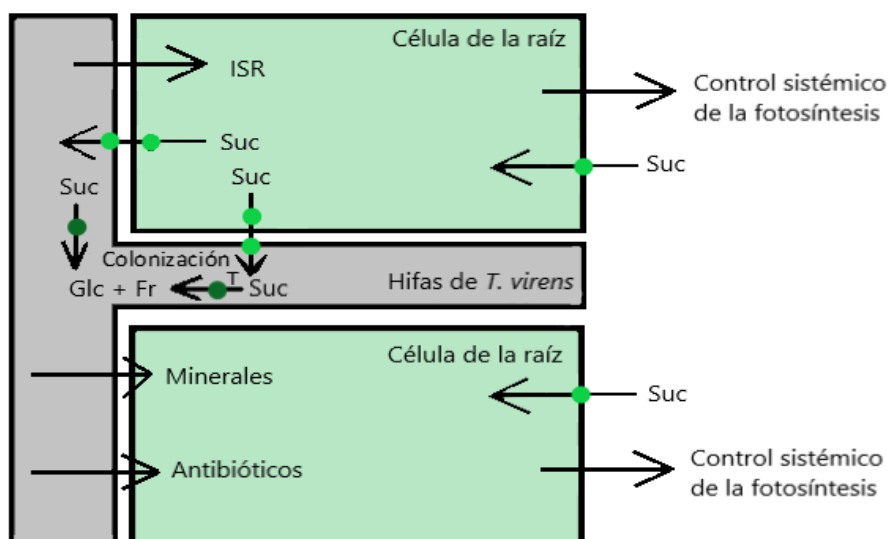
Según Benítez y col. (2004), las especies de *Trichoderma* más eficaces como agentes antagonistas son *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. virens* y *T. asperellum*, mientras que *T. reesei* se considera un organismo modelo debido a los métodos biológicos moleculares establecidos para esa especie y a las cepas recombinantes disponibles (Seidl y col., 2006). Estas especies de *Trichoderma* son capaces de controlar ascomicetos, basidiomicetos y oomicetos, y también se ha referido ampliamente su actividad frente a nematodos fitopatógenos, tanto en cereales (por ejemplo, Zhang y col., 2017) y soja, como en hortícolas (Gurpreet & Verma, 2017) y especies leñosas, aunque en la actualidad no existen formulados de *Trichoderma* en el registro oficial de productos fitosanitarios autorizados para su uso como nematocidas. Sin embargo, en el registro oficial de productos fitosanitarios (MAPAMA, 2018) están autorizadas contra hongos del suelo fitopatógenos cuatro de las especies de *Trichoderma*. Varias cepas de *T. asperellum* se emplean para combatir *Phythium* en hortícolas y *Fusarium* en clavel. Las combinaciones de *T. asperellum* y *T. atroviride* se usan en hortícolas contra *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Phythium*, *Phytophthora* y *Rhizoctonia*, y para *Sclerotinia* en flor cortada. Por su parte, *T. asperellum* y *T. gamsii* se usan conjuntamente en árboles frutales contra *Armillaria*, en hortícolas contra *Armillaria*, *Sclerotinia*, *Phythium*, *Phytophthora*, podredumbre de la raíz y *Verticillium* y en hierbas aromáticas y en ornamentales contra *Armillaria*, *Sclerotinia*, *Phytophthora* y podredumbre de la raíz. Las

cepas de *T. harzianum* se emplean contra *Phythium* en árboles y arbustos frutales, hierbas aromáticas y ornamentales, y hortícolas.

Es importante tener en cuenta que la respuesta de *Trichoderma* depende del agente patógeno al que va a controlar. Por ejemplo, en el estudio de Martínez y col. (2013) encontraron que la actividad de una de las enzimas producida durante la acción parasítica de *Trichoderma* sobre *Sclerotium rolfsii* no se detectó en la interacción de *Trichoderma* y *Rhizoctonia solani*. Es necesario identificar nuevas sustancias que sean bioactivas frente a fitopatógenos, por lo que se buscan nuevas especies y cepas de este género asociadas a la rizosfera de plantas cultivadas.

Además de por su uso como antagonistas de varios microorganismos patógenos de plantas, las especies de *Trichoderma* son beneficiosas para la agricultura ya que forman parte de la rizosfera competente, mejorando la sanidad de los cultivos y su adaptabilidad a condiciones de estrés (Harman y col., 2004; Sharma y col., 2017). Por ejemplo, un tricoteceno producido por *T. arundinaceum*, el Harzianum A, actúa como promotor del crecimiento (Malmierca y col., 2012).

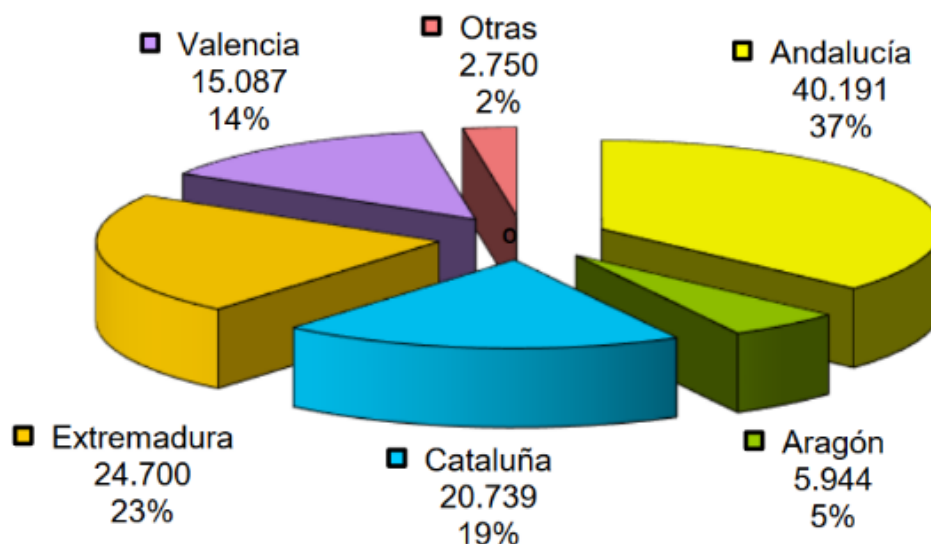
En el estudio de Vargas y col. (2013) se describen los efectos de *T. virens* en la fisiología de las plantas y se presentó como un modelo general en la asociación mutua entre *Trichoderma* y las raíces de las plantas (Figura 2). Las células fúngicas secuestran los minerales del suelo y activan los mecanismos de resistencia a las enfermedades en la planta, lo que requiere un consumo importante de energía, por lo que la sacarosa es un componente importante en este proceso.



**Figura 2.** Diagrama que representa la interacción molecular y metabólica entre *T. virens* y las raíces de las plantas. Suc – sacarosa, Glc – glucosa, Fr – fructosa, ISR - resistencia sistémica inducida (Vargas y col., 2013).

En los ecosistemas agrícolas, además de por factores microclimáticos, geográficos y edáficos, la microbiota del suelo puede verse afectada por la especie vegetal que se cultive, así como por la aplicación de fertilizantes y de productos fitosanitarios. En este sentido, las especies de *Trichoderma* han sido aisladas a partir del suelo y de la rizosfera de numerosos cultivos como trigo, centeno, maíz, arroz, patata, café, remolacha, etc. La composición de especies y la abundancia de las mismas varía en cada caso (Kredics y col., 2014).

El cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) puede constituir un agroecosistema interesante para aislar cepas de *Trichoderma* útiles para control biológico. Se han realizado estudios sobre la biodiversidad de este género en cultivos de arroz en Filipinas (Cumagun y col., 2006), Irán (Naeimi y col., 2011) o China (Jiang y col., 2016), pero no existen referencias al respecto en arrozales europeos. Las casi 110.000 ha que ocupa este cultivo en España se distribuyen en Andalucía, Extremadura, Cataluña, Comunidad Valenciana y Aragón (MAPAMA, 2017) (Figura 3), y están muy localizadas en zonas con elevada salinidad e importantes restricciones medioambientales, como deltas y marismas pertenecientes o próximas a parques naturales, y con suelos que sufren problemas de encharcamiento. Por ejemplo, la mayor superficie de cultivo se encuentra en las marismas del Guadalquivir, mientras que en Extremadura ocupa las vegas bajas del Guadiana, en Cataluña se encuentra en el delta del Ebro y en Valencia en la Albufera. En Aragón se cultiva arroz en las comarcas de Cinco Villas (Zaragoza) y Cinca Medio (Huesca), principalmente en suelos con un alto contenido en sales y en arcilla, y por lo tanto con mal drenaje.



**Figura 3.** Distribución de la superficie de arroz, expresada en hectáreas, en España por comunidades autónomas en el periodo 2016/2017 (MAPAMA, 2017).



## 2.- Objetivos

El objetivo general de este Trabajo Fin de Grado es aislar e identificar, tanto morfológica como molecularmente, cepas de hongos del género *Trichoderma* que puedan estar presentes en suelos dedicados al cultivo de arroz en varias regiones españolas. Paralelamente se estudió la diversidad fúngica existente en las parcelas analizadas.





### 3.- Material y métodos

#### 3.1.- Aislamiento de colonias fúngicas

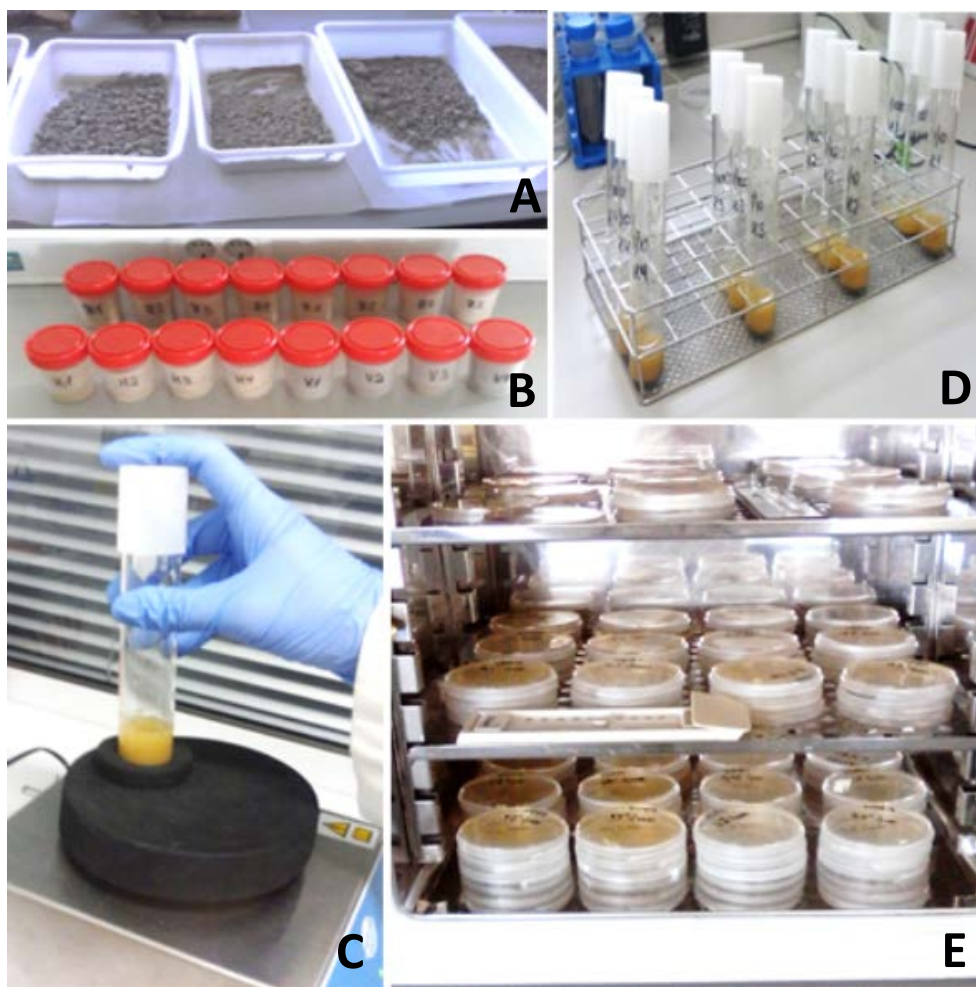
Para la realización del presente trabajo se recogieron 14 muestras de suelo (Tabla 1) en otros tantos campos dedicados al cultivo de arroz desde al menos 10 años. Las parcelas se encontraban en cuatro localidades de tres zonas arroceras diferentes: Extremadura, Aragón y Levante. En concreto se trataba de parcelas de las localidades de Don Benito (Badajoz), San Miguel del Cinca (Huesca), Sueca (Valencia) y Ejea de los Caballeros (Zaragoza).

La toma de muestras de suelo se realizó en la primavera de 2017, antes de la siembra. Para ello se recogió una porción de suelo de aproximadamente un kilogramo, tras separar los primeros 5 – 10 cm de la superficie.

**Tabla 1.** Localización de las parcelas en las que se recogieron las muestras de suelo empleadas en el estudio.

Muestra	Provincia	Localidad	Polígono	Parcela	Coord. X	Coord. Y
B.1	Badajoz	Don Benito	25	231	251.835,36	4.325.123,60
B.2			25	334	251.780,62	4.325.484,05
H.1	Huesca	San Miguel del Cinca	12	567	259.265,99	4.629.495,54
H.2			12	568	259.302,26	4.629.586,69
H.3			13	47	258.551,75	4.629.822,04
H.4			13	231	257.732,42	4.628.400,57
V.1	Valencia	Sueca	52	32	732.715,29	4.347.228,67
V.2			58	165	731.956,18	4.345.525,98
V.3			56	9	733.715,78	4.344.343,15
V.4			25	133	731.580,77	4.350.329,48
Z.1	Zaragoza	Ejea de los Caballeros	12	4	652.465,86	4.661.911,97
Z.2			15	7	650.448,35	4.656.709,47
Z.3			105	10294	648.203,36	4.652.101,33
Z.4			105	5153	647.652,45	4.659.856,37

Una vez en laboratorio, el suelo se colocó en bandejas plásticas (Figura 4A) para secarlo al aire durante una semana, a temperatura ambiente ( $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Una vez secas, las muestras se homogenizaron, se tamizaron empleando un tamiz de 0,8 mm y se preparó una alícuota de 100 g, que se conservó en frascos de plástico estériles (Figura 4B).



**Figura 4.** Procesamiento en laboratorio de las muestras del suelo. A) Secado al aire del suelo. B) Suelo seco y tamizado. C) Homogenización de la extracción en vórtex. D) Diluciones seriadas de cada muestra de extracto de suelo. E) Incubación de las placas de medio tras la siembra de las muestras.

De todas las muestras de suelo seco y tamizado se prepararon diluciones para determinar el pH y la conductividad eléctrica de las mismas. Para ello se colocaron en tubos 10 g de suelo, se añadieron 25 ml de agua destilada (dilución 1:2,5) y se incubaron en el agitador durante 15 – 20 min y al terminar se midió el pH. Se añadieron otros 25 ml de agua (dilución 1:5) y se agitaron los tubos manualmente durante 2 min, antes de determinar la conductividad.

La extracción de cepas fúngicas de las muestras se realizó empleando 1 g de suelo en 9 mL de H<sub>2</sub>O destilada estéril y mediante agitación en vórtex (Figura 4C). De cada alícuota se realizaron diluciones seriadas 1:100 y 1:1000, y se sembraron (Figura 4D) con cada una tres placas de medio PDA preparado de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Patata-Dextrosa-Agar, Panreac Cultimed) y tres placas en medio selectivo para *Trichoderma*, TSM (Tabla 2). Los componentes de este medio selectivo inhiben el desarrollo de bacterias y principalmente hongos y oomicetos de crecimiento rápido (Askew & Laing, 1993) dando

ventaja al crecimiento a *Trichoderma* spp. El aislamiento de colonias en PDA se realizó por duplicado, en dos experimentos independientes.

**Tabla 2.** Composición del medio selectivo para *Trichoderma* o TSM (Askew & Laing, 1993).

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad (g)</b>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,9
KCl	0,15
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1
Rosa de Bengala	0,15
D(+)-Glucosa	3
Agar	20
<b>Biocidas a añadir tras el autoclavado:</b>	
Cloranfenicol	0,25 g
Captan 80%	0,12 g
Previcur (Propamocarb)	1,2 mL

Las placas se incubaron en estufa a 24°C durante 4 días en caso de PDA y 7 días en caso de medio TSM (Figura 4E). Todas las colonias que mostraron características morfológicas de *Trichoderma* se purificaron repicando una parte a una placa nueva de PDA. De mismo modo, se repicó a PDA al menos una colonia de cada género fúngico identificado en las muestras.

### 3.2.- Identificación microscópica de las colonias fúngicas aisladas

Las observaciones al microscopio de la morfología del micelio se realizaron con aislados cultivados en PDA a 24 °C en oscuridad durante 3 días. Se hicieron preparaciones sobre portaobjetos donde se colocó, con ayuda de una lanceta, una pequeña cantidad del micelio, después se añadió una gota de agua destilada y se cubrió con la lámina de cubreobjetos con cuidado para no almacenar burbujas. Con estas preparaciones se realizaron observaciones al microscopio con diferentes aumentos.

Para la identificación morfológica de los aislados fúngicos obtenidos se utilizaron las claves especializadas (Barnett & Hunter, 1998).

Una vez identificadas a nivel de género las distintas colonias obtenidas, se realizaron recuentos de cada placa para estimar la abundancia de los hongos aislados. Para ello se determinó para cada género fúngico el número medio de colonias por placa, para cada medio (PDA o TSM) y dilución (1/100 o 1/1000).

### 3.3.- Caracterización molecular de los aislados fúngicos

El ADN genómico se aisló de colonias jóvenes de hongos (cuatro días de crecimiento en PDA) utilizando el kit Extract-N-Amp™ (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, EE.UU.) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Para ello en un tubo de 1,5 mL se dispusieron 20 µL de la solución “Extract” (o solución de extracción) a la que se añadió una pequeña cantidad del micelio del hongo recogido con una punta de micropipeta. A continuación, la muestra se incubó durante 10 minutos a 95 °C en un termobloque, agitando manualmente cada tubo a los 5 minutos mediante suaves inversiones. Transcurrido ese tiempo, los tubos se colocaron en un bloque de hielo y se añadieron a cada uno 20 µL de la solución “Dilute”. Las muestras se homogenizaron en vórtex durante aproximadamente 30 segundos y finalmente se les dio un “spin” en centrifuga (9000 rpm x 30 s) para separar el ADN de los restos del micelio. Las muestras extraídas se almacenaron a -20 °C hasta su empleo.

Para la amplificación mediante PCR de la región del ITS1 e ITS2 del ADN ribosómico de cada aislado fúngico se utilizaron los cebadores ITS1 e ITS4 (White y col., 1990) que flanquean las regiones ITS. La preparación de las reacciones se realizó en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar. Las reacciones contenían, en un volumen final de 50 µL

- 0,2 mM de los nucleótidos (dNTPs)
- 0,5 µM del cebador ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')
- 0,5 µM del cebador ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')
- 2,5 U de ADN polimerasa: Kapa *Taq* (Kapa Biosystems, Sigma-Aldrich).
- 4 µL de ADN genómico.

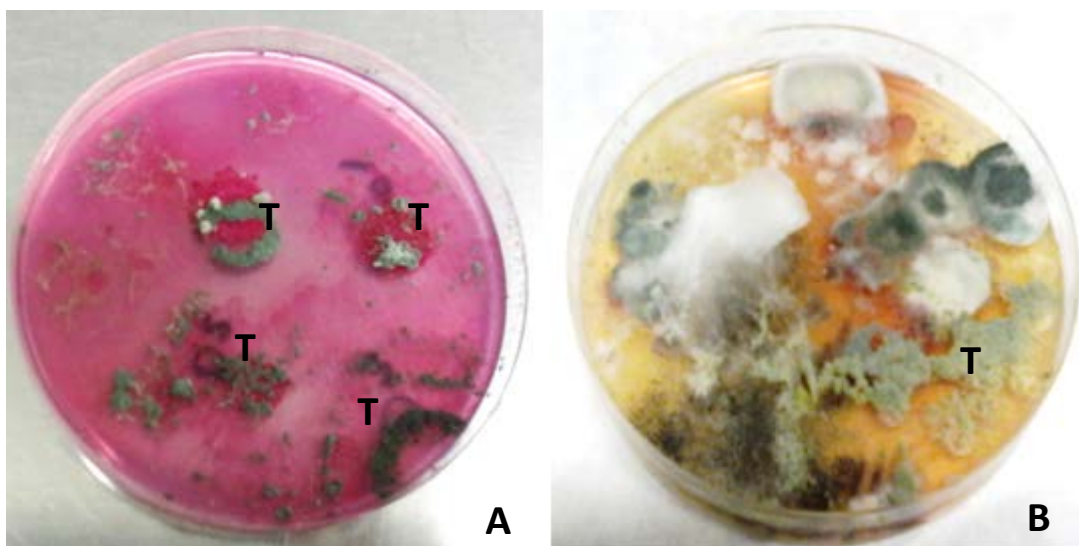
Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Applied Biosystems 9700. Las condiciones de la reacción fueron: 6 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 54 °C y 1 min a 72 °C; finalmente, una extensión de 7 min a 72 °C.

Una alícuota de 12 µL de cada reacción se empleó para comprobar las amplificaciones, mediante electroforesis horizontal en gel de TBE y agarosa al 1%, a 90 V durante una hora. El tamaño en pares de bases (bp) de los fragmentos obtenidos se estimó con la escalera de peso molecular de 100 bp Gene Ruler (Fermentas). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio para su visualización.

Los productos de amplificación se secuenciaron empleando los dos cebadores (STAB VIDA, Caparica, Portugal). Los cromatogramas recibidos se depuraron, y las secuencias directa y reversa de cada muestra se alinearon para obtener una secuencia consenso de cada aislado fúngico. Cada secuencia se alineó mediante la herramienta BLAST contra la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), para identificar la especie por similitud de secuencia. Para todas estas operaciones se empleó el software integral Geneious (Kearse y col., 2012).

## 4.- Resultados y discusión

A partir de las muestras de suelos de las 14 parcelas dedicadas al cultivo de arroz incluidas en este estudio fue posible aislar e identificar morfológicamente un total de 17 colonias de *Trichoderma* (Tabla 3), que crecieron tanto en placas con medio no selectivo PDA (Figura 5A) (5 colonias) como en medio selectivo TSM (Figura 5B) (12 colonias). En concreto se encontraron colonias de esta especie en las dos muestras tomadas en parcelas de Badajoz, en tres de las cuatro parcelas de Huesca, en una parcela de Valencia y en una de Zaragoza.



**Figura 5.** Colonias de *Trichoderma* (T) cultivadas en medio selectivo (A) y medio no selectivo (B) a partir de las muestras de suelos arroceros.

Como se ha mencionado, las especies de *Trichoderma* tienen la capacidad de crecer en suelos con una amplia gama de pH, aunque se encuentran mejor adaptadas a pHs ácidos. En nuestro caso, la mayor parte de las parcelas presentaron un pH básico (Tabla 3), puesto que solamente la parcela 2 de Badajoz presentó un pH ácido. Aunque pudieron aislarse colonias de *Trichoderma* en los suelos básicos, el mayor número de colonias se obtuvo precisamente en la parcela B.2, lo cual concuerda con la preferencia de *Trichoderma* por los suelos ácidos. En anteriores estudios realizados por nuestro grupo de investigación, se aislaron cepas de *Trichoderma harzianum* en suelos de explotaciones truferas de Aragón (Solís Hidalgo, 2017), en los que los pHs son mayoritariamente alcalinos.

**Tabla 3** Número total de colonias de *Trichoderma* aisladas a partir de 14 muestras de suelo procedentes de parcelas dedicadas al cultivo de arroz en Badajoz (B), Huesca (H), Valencia (V) y Zaragoza (Z). Se presentan también los resultados de las determinaciones de pH y conductividad de las muestras.

Muestra	pH	Conductividad (dS m <sup>-1</sup> )	<i>Trichoderma</i>	
			PDA	TSM
B.1	7,48	0,621	-	2
B.2	5,53	1,058	-	7
H.1	8,26	0,382	1	-
H.2	8,08	0,741	1	-
H.3	7,87	0,963	-	-
H.4	7,81	1,343	1	3
V.1	7,76	1,530	-	-
V.2	7,98	1,723	-	-
V.3	7,86	0,902	-	-
V.4	7,75	0,003	1	-
Z.1	8,08	0,897	-	-
Z.2	8,13	0,676	1	-
Z.3	8,21	1,000	-	-
Z.4	7,98	1,350	-	-
<i>Total</i>			5	12

Otro dato llamativo en estos resultados es el de la conductividad extremadamente baja del suelo de la parcela V.4, en el que sin embargo se pudo aislar una colonia de *Trichoderma* (Tabla 3). Esta parcela es en realidad una laguna de la Albufera de Valencia cubierta con aporte de suelo hace unos 300 años (Dr. Luis Marqués, comunicación personal), que además permanece inundada unos 8 meses al año (desde octubre a enero y desde mayo a agosto) debido a su ubicación.

Las 17 colonias de *Trichoderma* fueron cultivadas en placas de PDA y se pudieron observar las diferencias en la forma de crecimiento del hongo (Figura 6). Se aisló ADN a partir del micelio de cada colonia para su análisis molecular (Tabla 4). La secuenciación del fragmento ITS1 - ITS2 (Anejo 1) permitió identificar 15 colonias procedentes de parcelas de Badajoz, Huesca y Valencia, como pertenecientes a la especie *T. harzianum* (Figura 7A). Esta es la especie más cosmopolita, ha sido aislada de diversos cultivos y zonas geográficas (Samuels, 2006). También es una de las más comúnmente utilizadas en el control biológico de hongos, bacterias y oomicetos de plantas (Harman y col., 2004). La única colonia aislada de una parcela de Zaragoza se identificó como perteneciente a la especie *T. longibrachiatum* (Figura 7B). Finalmente, una de las 5 colonias aisladas en suelos de Huesca fue identificada como perteneciente a la especie *T. saturnisporum* (Figura 7C).



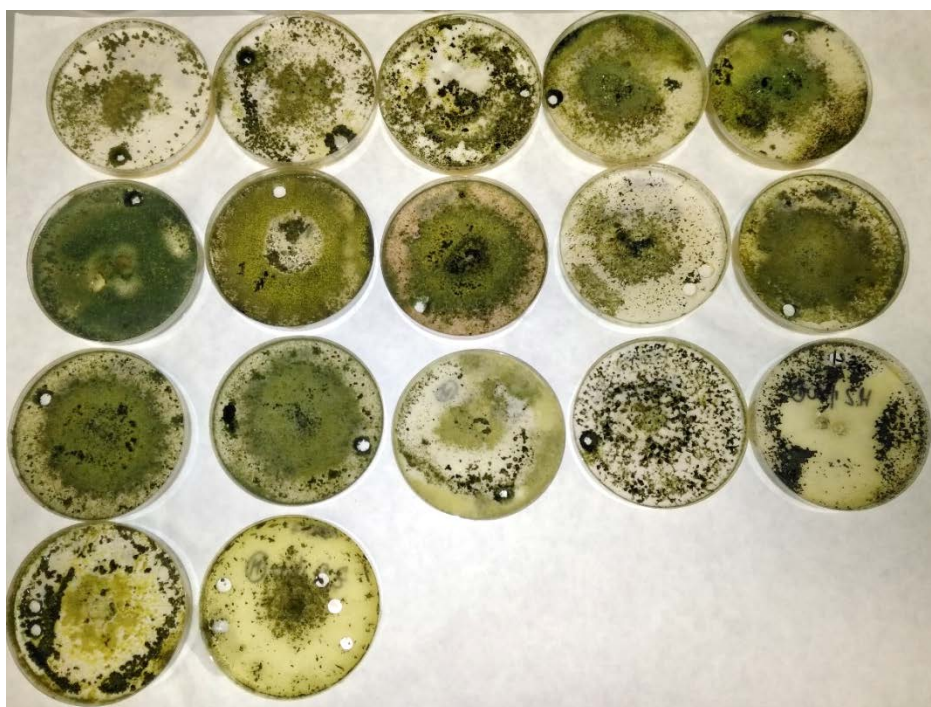
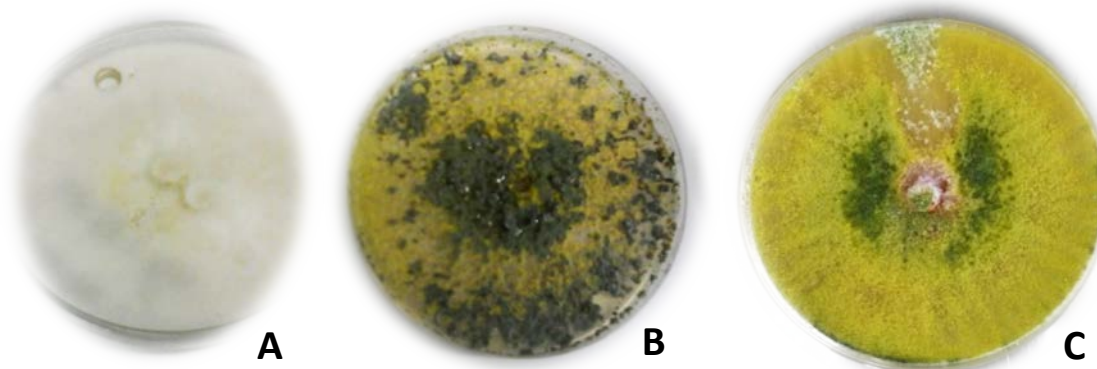


Figura 6. Todas las colonias de *Trichoderma* aisladas de los suelos arroceros con 21 días de crecimiento en PDA.

Tabla 4. Especies de *Trichoderma* identificadas a partir de las secuencias de la región ITS obtenidas para cada colonia aislada de muestras de suelos empleando diluciones 1/100 y 1/1000, tanto en medio básico como en medio selectivo. Para cada secuencia se muestra el porcentaje de similitud con la accesión de Genbank de mayor coincidencia.

Parcela	Dilución	Medio de cultivo	Nombre especie	Accesión Genbank	% Similitud
B.1	1/100	TSM	<i>Trichoderma harzianum</i>	KU935691	100,0
B.1	1/100	TSM	<i>Trichoderma harzianum</i>	KX421472	99,8
B.2	1/100	TSM	<i>Trichoderma harzianum</i> / <i>Trichoderma aureoviride</i>	KY425721 / KJ610807	100,0
B.2	1/100	TSM	<i>Trichoderma harzianum</i>	KU935691	100,0
B.2	1/100	TSM	<i>Trichoderma harzianum</i>	KX421472	99,8
B.2	1/100	TSM	<i>Trichoderma harzianum</i> / <i>Trichoderma aureoviride</i>	MG738308/ HQ596942	100,0
B.2	1/100	TSM	<i>Trichoderma harzianum</i>	KJ1767087	99,8
B.2	1/100	TSM	<i>Trichoderma harzianum</i>	KX421472	99,8
B.2	1/100	TSM	<i>Trichoderma harzianum</i>	KJ1767087	99,7
H.1	1/1000	PDA	<i>Thichoderma harzianum</i>	KR856225	100,0
H.2	1/100	PDA	<i>Trichoderma saturnisporum</i>	LM653121	100,0
H.4	1/100	TSM	<i>Trichoderma harzianum</i>	KX421472	99,8
H.4	1/100	TSM	<i>Trichoderma harzianum</i>	KX421472	99,8
H.4	1/100	TSM	<i>Trichoderma harzianum</i>	KX421472	99,8
H.4	1/1000	PDA	<i>Trichoderma harzianum</i>	MF671947	99,5
V.4	1/1000	PDA	<i>Trichoderma harzianum</i>	KU935691	100,0
Z.2	1/100	PDA	<i>Thichoderma longibrachiatum</i>	LT707585	99,8



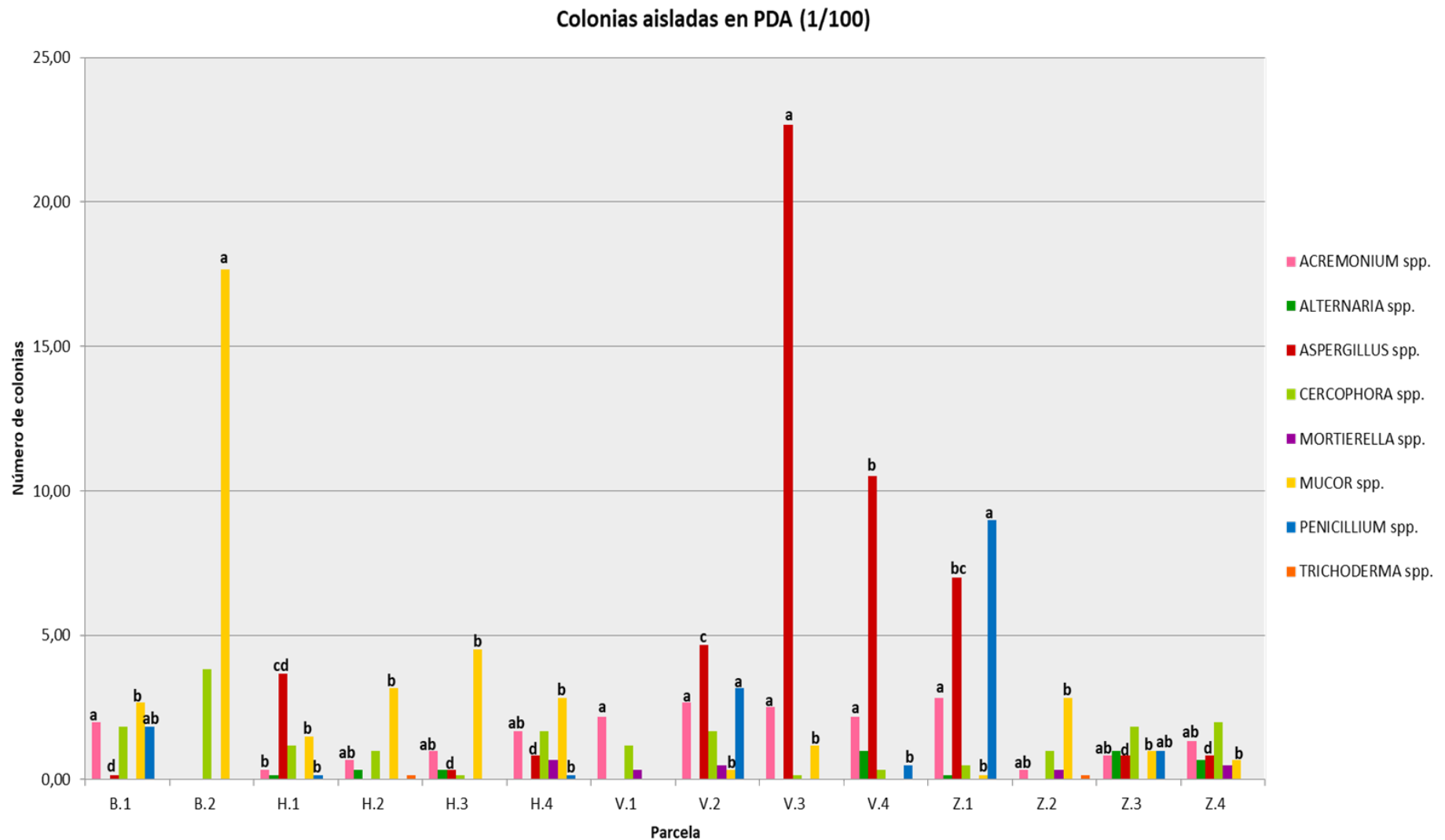
**Figura 7.** Colonias de *Trichoderma* aisladas de suelos dedicados al cultivo de arroz creciendo en medio PDA. Colonias de *T. harzianum* (A), *T. saturnisporum* (B) y *T. longibrachiatum* (C).

Las especies *Trichoderma longibrachiatum* y *T. saturnisporum* son menos conocidas, pero se han empleado en aplicaciones agrícolas. Zhang y col. (2016) demostraron la eficacia de la cepa T6 de *T. longibrachiatum* como promotor del crecimiento vegetal para incrementar la tolerancia del trigo a estrés salino. Por su parte, Diáñez Martínez y col. (2015) encontraron que dos cepas de *T. saturnisporum* inhibieron el crecimiento de ocho hongos fitopatógenos, entre los cuales se ensayaron *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora parasitica* y *P. capsici*. En este trabajo se demostró que compuestos volátiles y no volátiles de *T. saturnisporum* suprimieron el crecimiento micelial. Esta especie se ha aplicado también en sustratos para mejorar el crecimiento de plántulas en vivero (Marín-Guirao y col., 2016). En nuestro grupo de investigación se está testando el potencial de esta colonia de *Trichoderma* como agente biológico.

Las secuencias de las 17 colonias de *Trichoderma* se alinearon (ClustalW) y se encontraron 5 secuencias ITS diferentes entre las 15 colonias de *T. harzianum* obtenidas en el estudio (Anejo 1).

Paralelamente al cultivo e identificación de las colonias de *Trichoderma*, se estudiaron las otras colonias fúngicas que crecieron en las placas de PDA y TSM sembradas con los extractos de suelo. Se determinó el número medio de colonias por placa para cada género fúngico identificado morfológicamente. En la Figura 8 se muestran los valores obtenidos a partir de las 6 placas de medio PDA que se sembraron con 2 extractos de cada muestra de suelo. Además de *Trichoderma*, en estas placas se identificaron otros ocho géneros diferentes, de los cuales los más frecuentemente aislados fueron *Cercophora* (14 parcelas), *Acremonium* (13 parcelas), *Mucor* (12 parcelas) y *Aspergillus* (10 parcelas). Otros géneros fúngicos menos comunes fueron *Alternaria* (7 parcelas), *Penicillium* (7 parcelas), *Mortierella* (5 parcelas) y *Stachybotrys*, del que sólo se identificó una colonia en una parcela.





**Figura 8.** Número medio de colonias de distintos géneros fúngicos aisladas en medio PDA empleando una dilución 1/100 de extractos de suelos arroceros (14 parcelas de cuatro localidades españolas). Para cada género, valores con la misma letra no mostraron diferencias significativas de acuerdo al test U de Mann-Whitney).

Sin embargo, en medio selectivo para *Trichoderma*, como era de esperar, se pudieron cultivar, a partir de 3 placas con este medio, solo otros 5 géneros de hongos (Tabla 5). En concreto se identificaron colonias como pertenecientes a los géneros *Aspergillus* (9 parcelas), *Penicillium* (8 parcelas), *Mortierella* (4 parcelas), *Acremonium* (1 parcela) y *Alternaria* (1 parcela). Todos los géneros fúngicos identificados son comunes en los suelos o sobre materia orgánica en descomposición (Tiunov & Scheu, 1999; Wang y col., 2015).

**Tabla 5.** Número medio de colonias por placa para cada género fúngico identificado en TSM tras inocular extractos de suelo (dilución 1/100) de 14 parcelas dedicadas al cultivo de arroz en Badajoz (B), Huesca (H), Valencia (V) y Zaragoza (Z).

Parcela	<i>Acremonium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Mortierella</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Trichoderma</i>
B.1	-	-	1,0	0,3	1,0	0,7
B.2	-	-	3,0	-	3,7	2,7
H.1	-	-	-	-	-	-
H.2	0,7	-	0,3	-	-	-
H.3	-	-	19,7	-	-	-
H.4	-	-	3,3	3,0	-	1,0
V.1	-	-	-	0,3	-	-
V.2	-	-	0,3	-	5,7	-
V.3	-	-	2,3	-	2,0	-
V.4	-	-	-	-	0,3	-
Z.1	-	-	-	-	2,3	-
Z.2	-	0,7	1,7	-	0,7	-
Z.3	-	-	-	-	2,7	-
Z.4	-	-	3,0	-	-	-

Los datos del conteo de colonias en placas con PDA (Figura 8) fueron sometidos a análisis estadístico empleando el programa SPSS (IBM Statistics, EEUU). En primer lugar, se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnoff y se encontró que la distribución de los valores obtenidos no seguía una distribución normal, por lo que la variabilidad se analizó mediante una prueba no paramétrica, el test H de Kruskal-Wallis. Esta prueba determinó que existieron diferencias significativas entre las 14 parcelas analizadas para la distribución de cuatro géneros de hongos: *Acremonium* ( $P = 0,012$ ), *Aspergillus* ( $P < 0,001$ ), *Mucor* ( $P < 0,001$ ) y *Penicillium* ( $P < 0,001$ ), mientras que este análisis no detectó diferencias significativas para los géneros menos frecuentes: *Alternaria* ( $P = 0,074$ ), *Cercophora* ( $P = 0,078$ ), *Mortierella* ( $P = 0,120$ ) y *Trichoderma* ( $P = 0,516$ ). Para estudiar la existencia de diferencias significativas entre los promedios de las parcelas se realizó el test U de Mann-Whitney, el cual determinó que existía mayor abundancia del género *Acremonium* en los cuatro suelos de la provincia de Valencia y en un suelo de la provincia de Zaragoza, mientras que en el caso de *Aspergillus*, se encontró mayor abundancia en tres de los suelos procedentes de la provincia de Valencia, en un suelo de la provincia de Huesca y en un suelo de la provincia de Zaragoza. La mayor

presencia del género *Mucor* se encontró en los dos suelos de la provincia de Badajoz, en los cuatro de la provincia de Huesca y en uno de la provincia de Zaragoza. Por último, la mayor presencia de *Penicillium* se observó en un suelo de la provincia de Zaragoza y en uno de la provincia de Valencia. Se obtuvieron resultados similares cuando se analizaron los datos del número medio de colonias por placa en las siembras con extracto 1/1000 (datos no mostrados).

De cada género fúngico identificado morfológicamente se repicó a PDA al menos una colonia y se aisló su ADN para corroborar su identificación mediante la secuenciación de su región ITS. La Tabla 6 recoge las especies fúngicas que se determinaron en estos análisis.

**Tabla 6.** Especies fúngicas identificadas de los suelos de arroz de las cuatro provincias estudiadas. Para cada aislado se muestra el porcentaje de identificación de pares de bases y la accesión al Genbank.

Parcela	Dilución	Medio de cultivo	Nombre especie	Accesión Genbank	% Similitud
B.1	1/100	PDA	<i>Mucor circinelloides</i>	KT336541	98,6
B.2	1/100	TSM	<i>Aspergillus niger</i>	MG250397	100
H.2	1/100	TSM	<i>Acremonium sclerotigenum</i>	KT878352	99,7
H.3	1/100	TSM	<i>Aspergillus alabamensis</i>	KU933439	98,2
H.3	1/100	TSM	<i>Aspergillus carneus</i>	NR_135402	99,8
H.3	1/100	TSM	<i>Aspergillus niveus</i> (sin. <i>Fennellia nivea</i> )	JN246071 (FJ155814)	100
H.3	1/100	TSM	<i>Aspergillus niveus</i> (sin. <i>Fennellia nivea</i> )	KP131610 (FJ155814)	99,8
H.3	1/100	TSM	<i>Aspergillus terreus</i>	KU594266	99,5
H.4	1/1000	PDA	<i>Cercophora coprophila</i>	KT224861	99,6
V.1	1/100	PDA	<i>Mortierella alpina</i>	EU918703	99,4
V.2	1/100	TSM	<i>Penicillium samsonianum</i>	MF446622	99,4
V.2	1/1000		<i>Cercophora coprophila</i>	KT224861	99,6
V.3	1/100	TSM	<i>Penicillium halotolerans</i>	NR_1111812	100
V.3	1/1000	PDA	<i>Stachybotrys cf. elegans</i> (sin. <i>Achroiostachys aurantisporea</i> )	KP256004 (KU845804)	100
V.4	1/100	TSM	<i>Penicillium chrysogenum</i>	KT071714	100
Z.2	1/100	TSM	<i>Alternaria alternata</i> /	MF575850/	100
			<i>Alternaria arborescens</i> /	KU293592/	
			<i>Alternaria daucifolia</i> /	MG250392/	
			<i>Alternaria gaisen</i>	KU204746	
Z.2	1/100	TSM	<i>Aspergillus oryzae</i>	KP278179	99,8
Z.4	1/100	TSM	<i>Aspergillus tamarii</i>	KP165434	100

Respecto a las especies fúngicas identificadas en las parcelas de nuestro estudio, podemos destacar, que *Acremonium sclerotigenum* (Figura 9A) se considera un patógeno del suelo cuyos esclerocios son muy resistentes a condiciones adversas, permitiendo que el hongo sobreviva un período prolongado en el suelo (Mirtalebi y col., 2017).

Por su parte, los hongos del género *Alternaria* contaminan las frutas, verduras y cereales. *A. alternata* (Figura 9B) produce varias micotoxinas diferentes que pueden ser ingeridas tanto por el ganado como por los humanos (Brzonkalik y col., 2011). En Pakistán se identificó a la especie *A. arborescens* (Figura 9B) como la causante de manchas foliares de arroz (Akhtar y col., 2014), mientras que *A. gaisen* (Figura 9B) tiene el potencial de decolorar el efluente de destilería (Pant & Adholeya, 2007).

Las especies de *Aspergillus* pueden aislarse de multitud de hábitats como suelo, restos de plantas, compost y hojarasca (Sathiya Seelan y col., 2009). Por ejemplo, *A. alabamensis* (Figura 9C) se aisló de una rama de madera muerta y se estudió su posible actividad contra insectos (Krausert y col., 2015). Las especies *A. carneus* (Figura 9D) y *A. terreus* (Figura 9E) se aislaron de manglares de las Islas Borneo (Sathiya Seelan y col., 2009). Por otro lado, las especies *A. niveus* (Figura 9F) y *A. niger* (Figura 9G) son utilizadas para producir enzimas biotecnológicamente importantes en las industrias de alimentos y bebidas (Fernandes y col., 2017; Schuster y col., 2002). En Japón *A. oryzae* (Figura 9H) es tradicionalmente utilizado para la producción de alimentos y bebidas fermentados, por su capacidad de secretar grandes cantidades de proteínas (Machida y col., 2005). La especie *A. tamarii* (Figura 9J) forma complejos enzimáticos que pueden ser de gran importancia en la industria del almidón (Banjo y col., 2014).

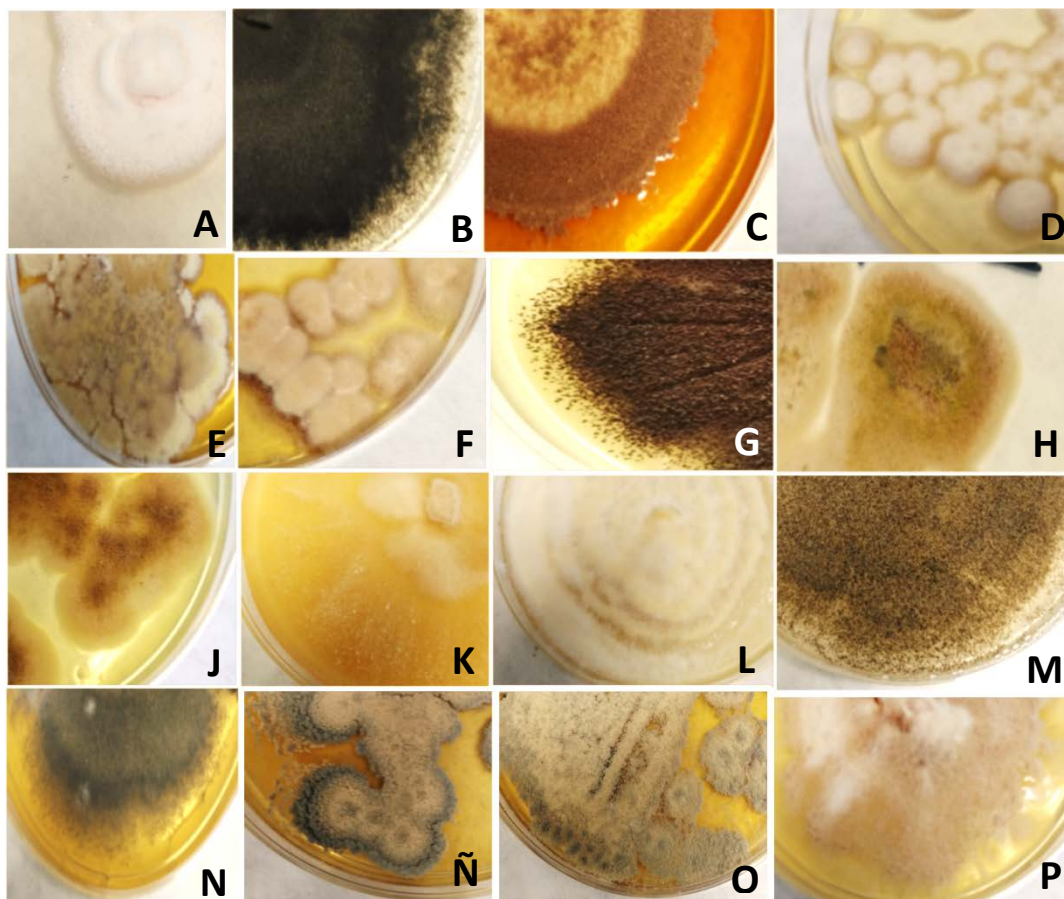
Los hongos coprófilos juegan un papel importante en la descomposición de materiales fecales, flujo de carbono y ecosistema energético. Entre ellos, *Cercophora coprophila* (Figura 9K) es la especie más común y ampliamente distribuida (Mustafa & Abdullah, 2011).

La especie *Mortierella alpina* (Figura 9L) se usa para la producción a gran escala de una variedad de ácidos grasos poliinsaturados (Sakuradani & Shimizu, 2009). *Mucor circinelloides* (Figura 9M) también tiene gran interés biotecnológico, ya que su micelio es una materia prima adecuada para producir biodiesel por transformación directa de sus lípidos (Gutiérrez y col., 2011).

Los hongos de la sección Chrysogena del género *Penicillium* son principalmente habitantes del suelo. Una de las especies más conocidas es *P. chrysogenum* (Figura 9N) por su importancia en la producción de penicilina y como contaminante de diversos alimentos (Houbraken y col., 2012). Otra de las especies de esta sección es *P. halotolerans* (Figura 9Ñ), fue añadida recientemente (Houbraken y col., 2012). La especie *P. samsonianum* (Figura 9O) de la sección Osmophila se aisló del suelo, aunque

se desconoce su hábitat primario y de ella se determinó la producción de patulina, una toxina fúngica que aparece en fruta dañada (Houbraken y col., 2016).

Por último, la especie *Stachybotrys cf. elegans* (Figura 9P) es un fuerte agente antagónico contra *Rhizoctonia solani*, un hongo patógeno que afecta a varias especies vegetales, como la patata (Wang y col., 2015).



**Figura 9.** Especies fúngicas aisladas a partir de los suelos arroceros que crecieron en medio PDA: *Acremonium sclerotigenum* (A), *Alternaria alternata* (B), *A. arborescens* (B), *A. gaisen* (B), *Aspergillus alabamensis* (C), *A. carneus* (D), *A. terreus* (E), *A. niveus* (F), *A. niger* (G), *A. oryzae* (H), *A. tamaritii* (J), *Cercophora coprophila* (K), *Mortierella alpina* (L), *Mucor circinelloides* (M), *Penicillium chrysogenum* (N), *P. halotolerans* (Ñ), *P. samsonianum* (O), *Stachybotrys cf. elegans* (P).



## 5.- Conclusiones

1. Se consiguió aislar 17 colonias del género *Trichoderma* de suelos dedicados al cultivo de arroz, en concreto en 9 de las 14 parcelas y en las 4 provincias muestreadas (B, H, V, Z).
2. La presencia de *Trichoderma* se detectó en suelos con mayoritariamente un pH básico. Sin embargo, el mayor número de colonias se aislaron precisamente en la única parcela con pH ácido, lo cual concuerda con la preferencia de *Trichoderma* por estos tipos de suelos.
3. Las colonias de *Trichoderma* crecieron tanto en el medio selectivo (12) como en el medio no selectivo (5), aunque en este último en menor cantidad.
4. Se identificaron morfológica y molecularmente tres especies diferentes pertenecientes al género *Trichoderma*: *T. harzianum* (15 colonias), *T. longibrachiatum* (1 colonia) y *T. saturnisporum* (1 colonia). *T. saturnisporum* es una especie poco conocida hasta el momento, pero los estudios existentes indican que puede tratarse de un nuevo y potente agente de control biológico.
5. Entre las 15 colonias de *T. harzianum* obtenidas en el estudio se encontraron 5 secuencias ITS diferentes.
6. Además, en este trabajo se han identificado colonias fúngicas de 18 especies diferentes pertenecientes a otros 8 géneros fúngicos presentes en suelos de arrozales: *Acremonium sclerotigenum*, *Alternaria alternata*, *A. arborescens*, *A. daucifolii* y *A. gaisen*, *Aspergillus alabamensis*, *A. carneus*, *A. niveus*, *A. oryzae*, *A. tamarii* y *A. terreus*, *Cercophora coprophila*, *Mortierella alpina*, *Mucor circinelloides*, *Penicillium samsonianum*, *P. halotolerans* y *P. chrysogenum* y *Strachybotrys cf. elegans*. Algunas de estas especies tienen importancia en la industria agroalimentaria o como agentes de control biológico, siendo varias de ellas fitopatógenas.





## 6.- Bibliografía

- Akhtar N., Bashir U. & Mushtaq S. (2014). First report of leaf spot of rice caused by *Alternaria arborescens* in Pakistan. *Plant Disease*, 98: 846 - 846.
- Askew D. J. & Laing M. D. (1993). An adapted selective medium for the quantitative isolation of *Trichoderma* species. *Plant Pathology*, 42: 686 - 690.
- Atanasova L., Druzhinina I. S. & Jaklitsch W. M. (2013). Two hundred *Trichoderma* species recognized on the basis of molecular phylogeny. En: *Trichoderma: biology and applications*. Editors: Mukherjee P. K., Horwitz B. A., Singh U. S., Mukherjee M. & Schmoll M. CABI Books. pp.10 - 42.
- Banjo T. T., Kareem S. O. & Akpan I. (2014). Production and characterization of amylase by mixed cultures of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Biokemistri*, 26: 101 - 106.
- Barnett H. L. & Hunter B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi* (No. Ed. 4). American Phytopathological Society (APS Press).
- Benítez T., Rincón A. M., Limón M. C. & Codón A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249 - 260.
- Berlitz D. L., Knaak N., Cassal M. C. & Fiuza L. M. (2014). *Bacillus* and Biopesticides in Control of Phytonematodes. In *Basic and Applied Aspects of Biopesticides*. Springer India. pp. 3 - 16.
- Bissett J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, 69: 2357 - 2372.
- Bissett J., Gams W., Jaklitsch W. & Samuels G. J. (2015). Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus*, 6: 263 - 295.
- Brzonkalik K., Herrling T., Sylatk C. & Neumann A. (2011). The influence of different nitrogen and carbon sources on mycotoxin production in *Alternaria alternata*. *International journal of food microbiology*, 147: 120 - 126.
- CABIInternacional. 2018. Index Fungorum, global fungal nomenclator. [en línea] consultado en 24 de abril de 2018. <http://www.speciesfungorum.org>.
- Cañizares Monteros C. A. (2003). *Estudio sobre poblaciones de hongos endofíticos provenientes de suelos supresivos al nematodo barrenador Radopholus similis (Cobb) Thorne en plantaciones comerciales de plátano en la zona de Talamanca, Costa Rica*. Escuela de Postgraduados del CATIE, Turrialba, Costa Rica.
- Chaverri P., Castlebury L. A., Overton B. E. & Samuels G. J. (2003). *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. *Mycologia*, 95: 1100 - 1140.
- Cumagun C. J. R., Hockenhull J. & Lübeck M. (2000). Characterization of *Trichoderma* Isolates from Philippine Rice Fields by UP-PCR and rDNA-ITS1 Analysis: Identification of UP-PCR Markers. *Journal of Phytopathology*, 148: 109 - 115.

- Diáñez Martínez F., Santos M., Carretero F. & Marín F. (2016). *Trichoderma saturnisporum*, a new biological control agent. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96: 1934 - 1944.
- Druzhinina I. S., Komoń-Zelazowska M., Ismaiel A., Jaklitsch W., Mullaw T., Samuels G. J. & Kubicek C. P. (2012). Molecular phylogeny and species delimitation in the section *Longibrachiatum* of *Trichoderma*. *Fungal Genetics and Biology*, 49: 358 - 368.
- Druzhinina I. S., Kopchinskiy A. G. & Kubicek C. P. (2006). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 47: 55 - 64.
- Druzhinina I. & Kubicek C.P. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *Journal of the Zhejiang University Science B*, 6: 100 - 112.
- Druzhinina I. S., Seidl-Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz B. A., Kenerley C. M., Monte E., Mukherjee P. K., Zeilinger S., Grigoriev I. V. & Kubicek C. P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 9: 749 - 759.
- Fernandes M. L. P., Jorge J. A. & Guimarães L. H. S. (2017). Characterization of an extracellular  $\beta$  - D - fructofuranosidase produced by *Aspergillus niveus* during solid-state fermentation (SSF) of cassava husk. *J Food Biochem*, 42: e12443.
- Ghorbanpour M., Omidvari M., Abbaszadeh-Dahaji P., Omidvar R. & Kariman K. (2018). Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biological Control*, 117: 147 - 157.
- Gurpreet S. & Verma K. K. (2017). Integrated management of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* infecting hybrid tomato. *Annals of Biology*, 33: 279 - 282.
- Gutiérrez A., López-García S. & Garre V. (2011). High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation. *Journal of microbiological methods*, 84: 442 - 446.
- Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I. & Lorito M. (2004). *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews. Microbiology*, 2: 43 - 56.
- Hassanein N. H. (2012). Biopotential of some *Trichoderma* spp. against cotton root rot pathogens and profiles of some of their metabolites. *African Journal of Microbiology Research*, 6: 4878 - 4890.
- Hatvani L., Manczinger L., Vágvölgyi C. & Kredics L. (2013). *Trichoderma* as a human pathogen. En: *Trichoderma: biology and applications*. Editors: Mukherjee P. K., Horwitz B. A., Singh U. S., Mukherjee M. & Schmoll M. CABI Books. pp. 292 - 313.
- Houbraken J., Frisvad J. C., Seifert K. A., Overy D. P., Tuthill D. M., Valdez J. G. & Samson R. A. (2012). New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section Chrysogena. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 29: 78 - 100.
- Houbraken J., Wang L., Lee H. B. & Frisvad J. C. (2016). New sections in *Penicillium* containing novel species producing patulin, pyripyropens or other bioactive compounds.

- Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 36: 299 - 314.
- Jiang Y., Wang J. L., Chen J., Mao L. J., Feng X. X., Zhang C. L. & Lin F. C. (2016). *Trichoderma* biodiversity of agricultural fields in East China reveals a gradient distribution of species. *PLoS ONE*, 11: e0160613.
- Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Ashton B., Thierer T., Meintjes P. & Drummond A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28: 1647 - 1649.
- Kopchinskiy A., Komoń M., Kubicek C. P. & Druzhinina I. S. (2005). *TrichoBLAST*: a multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. *Mycological Research* Volume, 109: 658 - 660.
- Krausert N. M., Dowd P. F., Peterson S. W., Wicklow D. T. & Gloer J. B. (2015). New antiinsectan dioxomorpholines from *Aspergillus alabamensis* NRRL 29810. *Planta Medica*, 81: PT31.
- Kredics L., Antal Z., Manczinger L., Szekeres A., Kevei F. & Nagy E. (2003). Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technology and Biotechnology*, 41: 37 - 42.
- Kredics L., Hatvani L., Naeimi S., Körmöczy P., Manczinger L., Vágvölgyi C. & Druzhinina I. (2014). Biodiversity of the genus *Hypocrea/Trichoderma* in different habitats. En: *Biotechnology and biology of Trichoderma*: 3 - 24.
- Kubicek C. P., Bissett J., Druzhinina I., Kullnig-Gradinger C. & Szakacs G. (2003). Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genetics and Biology*, 38: 310 - 319.
- Kullnig C., Szakacs G. & Kubicek C. P. (2000). Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. *Mycological Research*, 104: 1117 - 1125.
- Kumar M. & Ashraf S. (2017). Role of *Trichoderma* spp. as a Biocontrol Agent of Fungal Plant Pathogens. En: *Probiotics and Plant Health*. Editors: Kumar V., Kumar M., Sharma S. & Prasad R. Springer. pp. 497 - 506.
- Li Destri Nicosia M. G., Mosca S., Mercurio R. & Schena L. (2015). Dieback of *Pinus nigra* seedlings caused by a strain of *Trichoderma viride*. *Plant Disease*, 99: 44 - 49.
- Machida M., Asai K., Sano M., Tanaka T., Kumagai T., Terai G., Kusumoto K., Arima T., Akita O., Kashiwagi Y., Abe K., Gomi K., Horiuchi H., Kitamoto K., Kobayashi T., Takeuchi M., Denning D. W., Galagan J. E., Nierman W. C., Yu J., Archer D. B., Bennett J. W., Bhatnagar D., Cleveland T. E., Fedorova N. D., Gotoh O., Horikawa H., Hosoyama A., Ichinomiya A., Igarashi R., Iwashita K., Juvvadi P. R., Kato M., Kato Y., Kin T., Kokubun A., Maeda H., Maeyama N., Maruyama J., Nagasaki H., Nakajima T., Oda K., Okada K., Paulsen I., Sakamoto K., Sawano T., Takahashi M., Takase K., Terabayashi Y., Wortman J. R., Yamada O., Yamagata Y., Anazawa H., Hata Y., Koide Y., Komori T., Koyama Y., Minetoki T., Suharnan S., Tanaka A., Isono K., Kuhara S., Ogasawara N. & Kikuchi H.

- (2005). Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 438: 1157 - 1161.
- Malmierca M. G., Cardoza R. E., Alexander N. J., McCormick S. P., Hermosa R., Monte E. & Gutiérrez S. (2012). Involvement of *Trichoderma* trichothecenes in the biocontrol activity and induction of plant defense-related genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 4856 - 4868.
- MAPAMA, Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (2017). Arroz. En: Producciones agrícolas de cultivos herbáceos e industriales. <http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/arroz/>
- MAPAMA, Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (2018). Registro de Productos Fitosanitarios. <http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/productos/consusact.asp>
- Marín-Guirao J. I., Rodríguez-Romera P., Lupión-Rodríguez B., Camacho-Ferre F. & Tello-Marquina J. C. (2016). Effect of *Trichoderma* on horticultural seedlings' growth promotion depending on inoculum and substrate type. *Journal of applied microbiology*, 121: 1095 - 1102.
- Martínez B., Infante D. & Reyes Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28: 1 - 11.
- Mendoza-Mendoza A., Zaid R., Lawry R., Hermosa R., Monte E., Horwitz B. A. & Mukherjee P.K. (2018). Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: Role of the fungal secretome. *Fungal Biology Reviews*, 32: 62 - 85.
- Mirtalebi M., Banihashemi Z., Sabahi F. & Mafakheri H. (2017). Dieback of rose caused by *Acremonium sclerotigenum* as a new causal agent of rose dieback in Iran. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 14: e10SC03.
- Mustafa K. M. & Abdullah S. K. (2011). The *Coprophilous* Genera *Arnium* and *Cercophora* from North Iraq. *2nd Scientific Conference for Biological Science, Sci College, Mosul University*.
- Naeimi S., Khodaparast S. A., Javan-Nikkhan M., Vágvölgyi C. & Kredics L. (2011). Species Pattern and Phylogenetic Relationships of *Trichoderma* Strains in Rice Fields of Southern Caspian Sea, Iran. *Cereal Research Communications*, 39: 540 - 548.
- Pant D. & Adholeya A. (2007). Identification, ligninolytic enzyme activity and decolorization potential of two fungi isolated from a distillery effluent contaminated site. *Water, air, and soil pollution*, 183: 165 - 176.
- Sakuradani E. & Shimizu S. (2009). Single cell oil production by *Mortierella alpina*. *Journal of biotechnology*, 144: 31 - 36.
- Samuels G. J., Dodd S. L., Gams W., Castlebury L. A. & Petrini O. (2002). *Trichoderma* species

- associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 94: 146 - 170.
- Samuels G. J. (2006). *Trichoderma*: Systematics, the Sexual State, and Ecology. *Phytopathology*, 96: 195 - 206.
- Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J. C. & Van Dijck P. (2002). On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 59: 426 - 435.
- Schuster A. & Schmoll M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87: 787 - 799.
- Seelan J. S. S., Ali A. F. & Muid S. (2009). *Aspergillus* species isolated from mangrove forests in Borneo Island, Sarawak, Malaysia. *Journal of Threatened Taxa*, 1: 344 - 346.
- Seidl V., Schmoll M., Scherm B., Balmas V., Seiboth B., Migheli Q. & Kubicek C. P. (2006). Antagonism of *Pythium* blight of zucchini by *Hypocrea jecorina* does not require cellulase gene expression but is improved by carbon catabolite derepression. *FEMS Microbiology Letters*, 257: 145 - 151.
- Sharma V., Salwan R. & Sharma P. N. (2017). The comparative mechanistic aspects of *Trichoderma* and Probiotics: Scope for future research. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 100: 84 - 96.
- Singh A., Shahid M., Srivastava M., Pandey S., Sharma A. & Kumar V. (2014). Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation. *Virology & Mycology*, 3: 1 - 7.
- Solis Hidalgo Z. K. (2017). *Efectos de Rhizoctonia spp. binucleada y Trichoderma harzianum Rifai sobre la micorriza de Tuber melanosporum Vittad* (Tesis doctoral). Universidad de Zaragoza.
- Steyahert J. M., Weld R. J., Mendoza-Mendoza A., Krystofova S., Simkovic M., Varecka L. & Stewart A. (2013). Asexual Development in *Trichoderma*: From Conidia to Chamydospores. En: *Trichoderma: biology and applications*. Editors: Mukherjee P. K., Horwitz B. A., Singh U. S., Mukherjee M. & Schmoll M. CABI Books. pp. 86 - 109.
- Taylor J. W., Jacobson D. J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D. M., Hibbett D. S., Fisher & M. C. (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in Fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 31: 21 - 32.
- Tiunov A. V. & Scheu S. (1999). Microfungal communities in soil, litter and casts of *Lumbricus terrestris* L. (*Lumbricidae*): a laboratory experiment. *Applied Soil Ecology*, 14: 17 - 26.
- Vargas W. A., Laughlin D. & Kenerley C. M. (2013). *Trichoderma* in the Rhizosphere: Looking for Sugar? En: *Trichoderma: biology and applications*. Editors: Mukherjee P. K., Horwitz B. A., Singh U. S., Mukherjee M. & Schmoll M. CABI Books. pp. 144 - 151.
- Vicente M. F., Cabello A., Platas G., Basilio A., Diez M. T., Dreikorn S., Giacobbe R. A., Onishi J. C., Meinz M., Kurtz M. B., Rosenbach M., Thompson J., Abruzzo G., Flattery A., Kong L., Tsipouras A., Wilson K. E. & Pelaez F. (2001). Antimicrobial activity of ergokonin A from

- Trichoderma longibrachiatum*. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 806 - 813.
- Wang Y., Hyde K. D., McKenzie E. H., Jiang Y. L., Li D. W. & Zhao D. G. (2015). Overview of *Stachybotrys* (*Memnoniella*) and current species status. *Fungal Diversity*, 71: 17 - 83.
- White T. J., Bruns T., Lee S. J. W. T. & Taylor J. L. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18: 315 - 322.
- Woo S. L., Scala F., Ruocco M., & Lorito M. (2006). The Molecular Biology of the Interactions Between *Trichoderma* spp., Phytopathogenic Fungi, and Plants. *Phytopathology*, 96: 181 - 185.
- Xu J. (2016). Fungal DNA barcoding. *Genome*, 59: 913 - 932.
- Zachow C., Berg C., Müller H., Monk J. & Berg G. (2016). Endemic plants harbour specific *Trichoderma* communities with an exceptional potential for biocontrol of phytopathogens. *Journal of Biotechnology*, 235: 162 - 170.
- Zhang C., Druzhinina I. S., Kubicek C. P. & Xu T. (2005). *Trichoderma* biodiversity in China: evidence for a North to South distribution of species in East Asia. *FEMS Microbiology Letters*, 251: 251 - 257.
- Zhang S., Gan Y., Ji W., Xu B., Hou B. & Liu J. (2017). Mechanisms and Characterization of *Trichoderma longibrachiatum* T6 in Suppressing Nematodes (*Heterodera avenae*) in Wheat. *Frontiers in plant science*, 8: 1491.
- Zhang S., Gan Y. & Xu B. (2016). Application of Plant-Growth-Promoting Fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 Enhances Tolerance of Wheat to Salt Stress through Improvement of Antioxidative Defense System and Gene Expression. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1405.
- Zhang W., Cao J., Zhang S. & Wang C. (2016a). Effect of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi on the microbial community and maize growth under salt stress. *Applied soil ecology*, 107: 214 - 223.







**ANEJO 1.** Alineamiento (ClustalW) de las 17 secuencias de *Trichoderma* identificadas en este trabajo.

	1	10	20	30	40	50	60	
B. 2. 22	-----	-----	-----	-----	CTCCGTAGGTGAACCTGCGGA			Trichoderma harzianum
B. 2. 23	-----	-----	-----	-----	TCCGTAGGTGAACCTGCGGA			
B. 2. 24	-----	-----	-----	-----	CCTCCGTAGGTGAACCTGCGGA			
B. 1. 15	-----	-----	-----	-----	-----GACCTGCGGA			
H. 4. J	-----	-----	-----	-----	CCTCCGTAGGGTGACCTGCGGA			
B. 2. 18	-----	-----	-----	-----	-----ACCTGCGGA			
V. 4. H	-----	-----	-----	-----	-----ACCTGCGGA			
B. 2. 21	-----	-----	-----	-----	CTCCGTAGGTGAACCTGCGGA			
H. 1. L	TCTTTGGTCTTTTAGAGGAAGTAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACACGCGGA							
B. 2. 17	-----	-----	-----	-----	-----GGACCTGCGGA			T. saturnisporum
B. 1. 16	-----	-----	-----	-----	TCCGTAGGTGAACCTGCGGA			
H. 4. 3	-----	-----	-----	-----	CCTCCGTAGGTGAACCTGCGGA			
B. 2. 20	-----	-----	-----	-----	TCCGTAGGTGAACCTGCGGA			
H. 4. 1	-----	-----	-----	-----	GGGGCCCTCCGTAGGTGAACCTGCGGA			
H. 4. 2	-----	-----	-----	-----	CCTCCGTAGGTGAACCTGCGGA			
H. 2. K	-----	-----	-----	-----	CCTCCGTAGGTGAACCTGCGGA			
Z. 2. M	-----TAGAGGAAGTAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACACGCGGA							
B. 2. 22	GGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCC-AATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCC							T. longibrachiatum
B. 2. 23	GGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCC-AATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCC							
B. 2. 24	GGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCC-AATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCC							
B. 1. 15	GGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCC-AATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCC							
H. 4. J	GGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCC-AATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCC							
B. 2. 18	GGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCC-AATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCC							
V. 4. H	GGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCC-AATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCC							
B. 2. 21	GGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCC-AATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCC							
H. 1. L	GGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCC-AATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCC							
B. 2. 17	GGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCC-AATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCC							
B. 1. 16	GGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCC-AATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCC							T. longibrachiatum
H. 4. 3	GGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCC-AATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCC							
B. 2. 20	GGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCC-AATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCC							
H. 4. 1	GGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCC-AATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCC							
H. 4. 2	GGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCC-AATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCC							
H. 2. K	GGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCC-AATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCC							
Z. 2. M	GGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCC-AATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCC							
B. 2. 22	TCGGCGGGATCTC--TGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGA--CCAAGGCGCCCGCCGGA							
B. 2. 23	TCGGCGGGATCTC--TGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGA--CCAAGGCGCCCGCCGGA							
B. 2. 24	TCGGCGGGATCTC--TGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGA--CCAAGGCGCCCGCCGGA							
B. 1. 15	TCGGCGGGATCTC--TGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGA--CCAAGGCGCCCGCCGGA							
H. 4. J	TCGGCGGGATCTC--TGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGA--CCAAGGCGCCCGCCGGA							
B. 2. 18	TCGGCGGGATCTC--TGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGA--CCAAGGCGCCCGCCGGA							
V. 4. H	TCGGCGGGATCTC--TGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGA--CCAAGGCGCCCGCCGGA							
B. 2. 21	TCGGCGGGATCTC--TGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGA--CCAAGGCGCCCGCCGGA							
H. 1. L	TCGGCGGGATCTC--TGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGA--CCAAGGCGCCCGCCGGA							
B. 2. 17	TCGGCGGGATCTC--TGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGA--CCAAGGCGCCCGCCGGA							
B. 1. 16	TCGGCGGGATCTC--TGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGA--CCAAGGCGCCCGCCGGA							
H. 4. 3	TCGGCGGGATCTC--TGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGA--CCAAGGCGCCCGCCGGA							
B. 2. 20	TCGGCGGGATCTC--TGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGA--CCAAGGCGCCCGCCGGA							
H. 4. 1	TCGGCGGGATCTC--TGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGA--CCAAGGCGCCCGCCGGA							
H. 4. 2	TCGGCGGGATCTC--TGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGA--CCAAGGCGCCCGCCGGA							
H. 2. K	TCGGCGGGATCTC--TGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGA--CCAAGGCGCCCGCCGGA							
Z. 2. M	TCGGCGGGATTCTCTTGCCCCGGGCGCGTCGCAGCCCCGGATCCCATGGCGCCCGCCGGA							

	1	10	20	30	40	50	60
B. 2. 22	GGACCAACC	-AAA	ACTCTTTT	TGTATACCC	-----	CC--TCGCGG	----GTTTTTT
B. 2. 23	GGACCAACC	-AAA	ACTCTTTT	TGTATACCC	-----	CC--TCGCGG	----GTTTTTT
B. 2. 24	GGACCAACC	-AAA	ACTCTTTT	TGTATACCC	-----	CC--TCGCGG	----GTTTTTT
B. 1. 15	GGACCAACC	-AAA	ACTCTTTT	TGTATACCC	-----	CC--TCGCGG	----GTTTTTT
H. 4. J	GGACCAACC	-AAA	ACTCTTTT	TGTATACCC	-----	CC--TCGCGG	----GTTTTTT
B. 2. 18	GGACCAACC	-AAA	ACTCTTTT	TGTATACCC	-----	CC--TCGCGG	----GTTTTTT
V. 4. H	GGACCAACC	-AAA	ACTCTTTT	TGTATACCC	-----	CC--TCGCGG	----GTTTTTT
B. 2. 21	GGACCAACC	-AAA	ACTCTTATT	TGTATACCC	-----	CC--TCGCGG	----GTTTTTT
H. 1. L	GGACCAACC	-AAA	ACTCTTATT	TGTATACCC	-----	CC--TCGCGG	----GTTTTTT
B. 2. 17	GGACCAACC	-AAA	ACTCTTATT	TGTATACCC	-----	CC--TCGCGG	----GTTTTTT
B. 1. 16	GGACCAACC	-AAA	ACTCTTTT	TGTATACCC	-----	CC--TCGCGG	----GTTTTTT
H. 4. 3	GGACCAACC	-AAA	ACTCTTTT	TGTATACCC	-----	CC--TCGCGG	----GTTTTTT
B. 2. 20	GGACCAACC	-AAA	ACTCTTTT	TGTATACCC	-----	CC--TCGCGG	----GTTTTTT
H. 4. 1	GGACCAACC	-AAA	ACTCTTTT	TGTATACCC	-----	CC--TCGCGG	----GTTTTTT
H. 4. 2	GGACCAACC	-AAA	ACTCTTTT	TGTATACCC	-----	CC--TCGCGG	----GTTTTTT
H. 2. K	GGACCAAC	--CAA	ACTCTTTT	CTCTCTCCG	TCGCGGCTCC	-GTCGCGGCTCT	GTTTTTAT
Z. 2. M	GGACCAACT	CCAA	ACTCTTTT	-TCTCTCCG	TCGCGGCTCC	CGTCGCGGCTCT	GTTTTTAT
B. 2. 22	--ATAATCTGAGCCTT	-CTCGGCGCCTCT	CGTAGGCGTTT	CGAAAATGAATCAAAA	CTTT		
B. 2. 23	--ATAATCTGAGCCTT	-CTCGGCGCCTCT	CGTAGGCGTTT	CGAAAATGAATCAAAA	CTTT		
B. 2. 24	--ATAATCTGAGCCTT	-CTCGGCGCCTCT	CGTAGGCGTTT	CGAAAATGAATCAAAA	CTTT		
B. 1. 15	--ATAATCTGAGCCTT	-CTCGGCGCCTCT	CGTAGGCGTTT	CGAAAATGAATCAAAA	CTTT		
H. 4. J	--ATAATCTGAGCCTT	-CTCGGCGCCTCT	CGTAGGCGTTT	CGAAAATGAATCAAAA	CTTT		
B. 2. 18	--ATAATCTGAGCCTT	-CTCGGCGCCTCT	CGTAGGCGTTT	CGAAAATGAATCAAAA	CTTT		
V. 4. H	--ATAATCTGAGCCTT	-CTCGGCGCCTCT	CGTAGGCGTTT	CGAAAATGAATCAAAA	CTTT		
B. 2. 21	T-ATAATCTGAGCCTT	-CTCGGCGCCTCT	CGTAGGCGTTT	CGAAAATGAATCAAAA	CTTT		
H. 1. L	T-ATAATCTGAGCCTT	-CTCGGCGCCTCT	CGTAGGCGTTT	CGAAAATGAATCAAAA	CTTT		
B. 2. 17	TTATAATCTGAGCCTT	-CTCGGCGCCTCT	CGTAGGCGTTT	CGAAAATGAATCAAAA	CTTT		
B. 1. 16	--ATAATCTGAGCCTT	-CTCGGCGCCTCT	CGTAGGCGTTT	CGAAAATGAATCAAAA	CTTT		
H. 4. 3	--ATAATCTGAGCCTT	-CTCGGCGCCTCT	CGTAGGCGTTT	CGAAAATGAATCAAAA	CTTT		
B. 2. 20	--ATAATCTGAGCCTT	-CTCGGCGCCTCT	CGTAGGCGTTT	CGAAAATGAATCAAAA	CTTT		
H. 4. 1	--ATAATCTGAGCCTT	-CTCGGCGCCTCT	CGTAGGCGTTT	CGAAAATGAATCAAAA	CTTT		
H. 4. 2	--ATAATCTGAGCCTT	-CTCGGCGCCTCT	CGTAGGCGTTT	CGAAAATGAATCAAAA	CTTT		
H. 2. K	TTTTGCTCTGAGCCTTT	CTCGGCGACCTAG	CGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAAA	CTTT			
Z. 2. M	TTTTGCTCTGAGCCTTT	CTCGGCGACCTAG	CGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAAA	CTTT			
B. 2. 22	CAACAACGGATCTCTTGGTTCT	TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT					
B. 2. 23	CAACAACGGATCTCTTGGTTCT	TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT					
B. 2. 24	CAACAACGGATCTCTTGGTTCT	TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT					
B. 1. 15	CAACAACGGATCTCTTGGTTCT	TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT					
H. 4. J	CAACAACGGATCTCTTGGTTCT	TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT					
B. 2. 18	CAACAACGGATCTCTTGGTTCT	TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT					
V. 4. H	CAACAACGGATCTCTTGGTTCT	TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT					
B. 2. 21	CAACAACGGATCTCTTGGTTCT	TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT					
H. 1. L	CAACAACGGATCTCTTGGTTCT	TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT					
B. 2. 17	CAACAACGGATCTCTTGGTTCT	TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT					
B. 1. 16	CAACAACGGATCTCTTGGTTCT	TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT					
H. 4. 3	CAACAACGGATCTCTTGGTTCT	TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT					
B. 2. 20	CAACAACGGATCTCTTGGTTCT	TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT					
H. 4. 1	CAACAACGGATCTCTTGGTTCT	TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT					
H. 4. 2	CAACAACGGATCTCTTGGTTCT	TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT					
H. 2. K	CAACAACGGATCTCTTGGTTCT	TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT					
Z. 2. M	CAACAACGGATCTCTTGGTTCT	TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT					

	1	10	20	30	40	50	60
B. 2. 22	GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTAT						
B. 2. 23	GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTAT						
B. 2. 24	GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTAT						
B. 1. 15	GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTAT						
H. 4. J	GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTAT						
B. 2. 18	GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTAT						
V. 4. H	GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTAT						
B. 2. 21	GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTAT						
H. 1. L	GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTAT						
B. 2. 17	GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTAT						
B. 1. 16	GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTAT						
H. 4. 3	GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTAT						
B. 2. 20	GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTAT						
H. 4. 1	GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTAT						
H. 4. 2	GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTAT						
H. 2. K	GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTAT						
Z. 2. M	GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTAT						
B. 2. 22	TCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGC						
B. 2. 23	TCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGC						
B. 2. 24	TCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGC						
B. 1. 15	TCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGC						
H. 4. J	TCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGC						
B. 2. 18	TCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGC						
V. 4. H	TCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGC						
B. 2. 21	TCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGC						
H. 1. L	TCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGC						
B. 2. 17	TCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGC						
B. 1. 16	TCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGC						
H. 4. 3	TCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGC						
B. 2. 20	TCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGC						
H. 4. 1	TCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGC						
H. 4. 2	TCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGC						
H. 2. K	TCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGC						
Z. 2. M	TCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGC						
B. 2. 22	GTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCG						
B. 2. 23	GTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCG						
B. 2. 24	GTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCG						
B. 1. 15	GTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCG						
H. 4. J	GTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCG						
B. 2. 18	GTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCG						
V. 4. H	GTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCG						
B. 2. 21	GTTGGGGATCGGCCCTGCCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCG						
H. 1. L	GTTGGGGATCGGCCCTGCCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCG						
B. 2. 17	GTTGGGGATCGGCCCTGCCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCG						
B. 1. 16	GTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCG						
H. 4. 3	GTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCG						
B. 2. 20	GTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCG						
H. 4. 1	GTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCG						
H. 4. 2	GTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCG						
H. 2. K	GTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCG						
Z. 2. M	GTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCG						

	1	10	20	30	40	50	60
B. 2. 22							
B. 2. 23	CAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCG						
B. 2. 24	CAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCG						
B. 1. 15	CAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCG						
H. 4. J	CAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCG						
B. 2. 18	CAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCG						
V. 4. H	CAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCG						
B. 2. 21	CAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCG						
H. 1. L	CAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCG						
B. 2. 17	CAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCG						
B. 1. 16	CAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCG						
H. 4. 3	CAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCG						
B. 2. 20	CAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCG						
H. 4. 1	CAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCG						
H. 4. 2	CAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCG						
H. 2. K	CAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGGCCACAGCCG						
Z. 2. M	CAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGGCCACAGCCG						
B. 2. 22	TTAAACACCC--AACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT						
B. 2. 23	TTAAACACCC--AACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT						
B. 2. 24	TTAAACACCC--AACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT						
B. 1. 15	TTAAACACCC--AACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT						
H. 4. J	TTAAACACCC--AACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT						
B. 2. 18	TTAAACACCC--AACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT						
V. 4. H	TTAAACACCC--AACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT						
B. 2. 21	TTAAACACCC--AACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT						
H. 1. L	TTAAACACCC--AACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT						
B. 2. 17	TTAAACACCC--AACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT						
B. 1. 16	TTAAACACCC--AACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT						
H. 4. 3	TTAAACACCC--AACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT						
B. 2. 20	TTAAACACCC--AACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT						
H. 4. 1	TTAAACACCC--AACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT						
H. 4. 2	TTAAACACCC--AACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT						
H. 2. K	TAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGT-GACCTCGGATCAG-TAGAACCT-----						
Z. 2. M	TAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT						
B. 2. 22	TAAGCATATCAATAAGCGGAGGA--						
B. 2. 23	TAAGCATATCAATAAGCGGAGGA--						
B. 2. 24	TAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAC						
B. 1. 15	TAAGCATATCA-TAA-----						
H. 4. J	TAAGCATATCA-TAA-----						
B. 2. 18	TAAGCATATCA-TAA-----						
V. 4. H	TAAGCATATCA-TA-----						
B. 2. 21	TAAGCATATCAATAAG-----						
H. 1. L	TAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA-						
B. 2. 17	TAAGCATATCA-TAA-----						
B. 1. 16	TAAGCATATCA-TA-----						
H. 4. 3	TAAGCATATCAATAACGGGA-----						
B. 2. 20	TAAGCATATCAATAAG-----						
H. 4. 1	TAAGCATATCAATAAG-----						
H. 4. 2	TAAGCATATCAATAAGC-----						
H. 2. K	-----						
Z. 2. M	TAAGCATATCAATAAGCCGGAGGA-						